UNIVERSITÉ DE PARIS - FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1963 N°

# THÈSES

pour le

## DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

soutenues publiquement le :

par

**Jean-Bernard LE PECQ**

---

**I — DE LA MESURE DES DIMENSIONS MOLÉCULAIRES DES POLYMÈRES BIOLOGIQUES ET DE SA SIGNIFICATION :** Application à l'étude physico-chimique et enzymatique de la complexation de l'acide désoxyribonucléique.

**II — PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ.**

---

Travail de l'Unité de Biochimie de l'Institut Gustave-Roussy (Villejuif) et du Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène industrielle de la Faculté de Pharmacie de Paris.

---

Jury
MM. GUILLOT, Président
TRUHAUT, Professeur
PAOLETTI, Maître de Conférences

---

UNIVERSITÉ DE PARIS - FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1963 N°

# THÈSES

pour le

## DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

soutenues publiquement le :

par

**Jean-Bernard LE PECQ**

---

**I — DE LA MESURE DES DIMENSIONS MOLÉCULAIRES DES POLYMÈRES BIOLOGIQUES ET DE SA SIGNIFICATION :** Application à l'étude physico-chimique et enzymatique de la complexation de l'acide désoxyribonucléique.

**II — PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ.**

---

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Travail de l'Unité de Biochimie de l'Institut Gustave-Roussy (Villejuif) et du Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Industrielle de la Faculté de Pharmacie de Paris.

---

Jury { MM. GUILLOT, Président
TRUHAUT, Professeur
PAOLETTI, Maître de Conférences }

---

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550205_0031

# PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

## ADMINISTRATION

| | |
|---|---|
| MM. G. VALETTE | - Doyen |
| M-M. JANOT | - Assesseur |
| P. MALANGEAUX | - Assesseur |
| L. RODINEAU | - Secrétaire Général |
| L. JEANDEL | - Secrétaire Général Adjoint |
| Mme S. CERTAIN | - Secrétaire |
| M.L. ESBINASSE | - Secrétaire |
| G. FROISSART | - Secrétaire |

## DOYEN HONORAIRE

| | |
|---|---|
| M. R. FABRE | Président de l'Académie de Médecine<br>Membre de l'Institut |

## PROFESSEURS HONORAIRES

| | |
|---|---|
| MM. M. DELEPINE | Membre de l'Institut |
| L. LAUNOY | |
| P. FLEURY | |
| M. MASCRE | |
| M. PICON | |
| C. BEDEL | |
| R. FABRE | Président de l'Académie de Médecine<br>Membre de l'Institut |

## PROFESSEURS

| | |
|---|---|
| MM. M-M. JANOT | Pharmacie galénique (T.) |
| G. VALETTE | Pharmacodynamie (T.) |
| R. PARIS | Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T.) |
| M. GUILLOT | Physique (T.) |
| J. GAUTIER | Chimie Organique (T.) |
| Mlle S. LAMBIN | Microbiologie (T.) |
| MM. Y. RAOUL | Physiologie (T.) |
| J. COURTOIS | Chimie biologique (T.) |
| L. DOMANGE | Chimie minérale (T.) |
| P. CRETE | Botanique (T.) |
| R. TRUHAUT | Toxicologie et Hygiène industrielle (T.) |
| A. MORETTE | Hydrologie (T.) |
| R. CAVIER | Parasitologie (T.) |
| A. QUEVAUVILLER | Hygiène et Education sanitaire (T.) |
| R. MOREAU | Pharmacie chimique (T.) |
| J. GUY | Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologique (T.P.) |
| A. GERMAN | Virologie et Sérologie (T.P.) |
| M. PIETTE | Biologie sanguine (T.P. |
| P. MALANGEAU | Chimie analytique (T.) |
| M. GIRARD | Chimie appliquée à l'expertise (T.) |
| G. DILLEMANN | Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T.) |

| | |
|---|---|
| MM. J. FLAHAUT | Minéralogie (T.P.) |
| G. DEYSSON | Cytologie végétale (T.P.) |
| A. LE HIR | Pharmacie galénique |
| J. RENAULT | Chimie organique |
| C. BOUDENE | Toxicologie et Hygiène industrielle |
| R. LARUELLE | Physique |
| P. ROSSIGNOL | Pharmacodynamie |
| A. MANGEOT | Pharmacie galénique industrielle |
| P. DELAVEAU | Matière médicale |

MAITRES DE CONFERENCES

| | |
|---|---|
| MM. Y. COHEN | Sciences naturelles |
| G. LE MOAN | Toxicologie |
| H. RENAULT | Pharmacie chimique |
| C. PAOLETTI | Sciences appliquées |
| P. REYNAUD | Sciences physico-chimiques |
| J. POISSON | Sciences naturelles |
| A. DESVIGNES | Microbiologie |
| F. PERCHERON | Biochimie |
| J. SAVEL | Sciences naturelles |
| J. BORY | Sciences naturelles |

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

| | |
|---|---|
| MM. P. BINET | Parasitologie |
| A. CAVE (F.F.) | Pharmacotechnie chimique et galénique |
| P. CORRIEZ | Physique |
| C. DREUX | Electrochimie appliquée à l'analyse |
| P. GESTEAU | Physique biologique |
| J. GOUNELLE | Analyse appliquée au contrôle des médicaments (section Biologie) |
| H. GUERIN | Micrographie (3è année) Biologie végétale |
| J. HARISPE | Chimie générale et pharmaceutique |
| J. HENRY | Chimie (4è année) |
| Mme J. HUBERT | Microbiologie |
| MM. R. LELUC | Microbiologie |
| M. LEMONNIER | Chimie analytique (2è et 3è années) |
| Mme S. LEMONTEY | Chimie (4è année) |
| Mlle S. LONGUEVALLE | Service des examens de chimie |
| Mlle H. MORIN | Pharmacodynamie et essais biologiques des médicaments |
| MM. F. PELLERIN | Chimie analytique (2è et 3è années) |
| R. PERLES | Chimie biologique |
| J. PESTIS (F.F.) | Biologie animale |
| R. POULLAIN | Hématologie |
| Mme M. ROBERT | Sérologie |
| Mlle A. ROLLEN | Biologie végétale |
| Mlle L. SEGUIN (F.F.) | Analyse appliquée au contrôle des médicaments (Section physico-chimie) |
| Mme SEILLER (F.F.) | Pharmacie galénique industrielle |
| M. J. YONGER (F.F.) | Chimie analytique (Ire année) |

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE
ET DE PHARMACODYNAMIE

| | |
|---|---|
| M. J. MANDEREAU | Chef de travaux pratiques de pharmacotechnie galénique |

## BIBLIOTHEQUE

| | |
|---|---|
| Mlle Y. RUYSSEN | Conservateur, chargé de la Direction |
| Mlle S. LAVAUD | Conservateur |
| Mme G. KREHMER | Conservateur |
| Mme A. DESGRIPPES | Bibliothécaire |

A mon Père et à ma Mère,

en témoignage de ma reconnaissance
et de ma profonde affection

A mes Frère et Soeur,

A ma Famille,

A mes Amis.

A Monsieur le Professeur M. GUILLOT

Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie,

Membre de l'Académie de Médecine,

Chevalier de la Légion d'Honneur,

qui nous a fait le grand honneur d'accepter de juger notre travail et de présider notre jury,

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre respectueux dévouement.

A Monsieur le Professeur R. TRUHAUT

Professeur de Toxicologie et d'Hygiène industrielle à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Pharmacien des Hôpitaux Psychiatriques de la Seine,

Directeur de l'Unité de Chimiothérapie de l'Institut GUSTAVE ROUSSY,

Officier de la Légion d'Honneur,

qui nous a fait le grand honneur de nous compter parmi ses élèves. Par sa vaste culture scientifique, son dynamisme, son expérience incomparable, il s'est imposé à nous comme à tous ses collaborateurs et élèves non seulement comme un maître dont l'enseignement est recherché mais également comme un modèle idéal.

Nous le prions de bien vouloir accepter l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre respectueux dévouement.

A Monsieur le Professeur Agrégé C. PAOLETTI

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris,

Directeur de l'Unité de Biochimie de l'Institut Gustave Roussy,

Pharmacien chimiste de 1ère Classe de la Marine,

qui fut notre premier maître de biochimie à l'Ecole nationale de Médecine et de Pharmacie de Tours et qui dès cet instant s'est révélé à nous comme un scientifique d'un dynamisme et d'une foi inhabituelle. Nous avons eu la chance par la suite, au laboratoire, de pouvoir découvrir en lui, non seulement le maître que l'on souhaite, mais l'homme et l'ami que l'on estime.

Que ce travail soit pour lui un témoignage de notre reconnaissance et qu'il soit assuré de notre respectueux dévouement.

A Monsieur le Professeur Agrégé P.F. DENOIX

Directeur de l'Institut Gustave Roussy,

Chirurgien des Hôpitaux de Paris,

Officier de la Légion d'Honneur,

qui nous a fait le grand honneur de nous accepter à l'Institut Gustave Roussy, qu'il dirige avec sa souriante et bienveillante efficacité, et nous a permis de réaliser ce travail.

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et qu'il soit assuré de notre respectueux dévouement.

A Monsieur le Docteur M. JOLY

Directeur de Recherches au C.N.R.S.

qui nous a fait le grand honneur de nous accepter pendant un an dans son laboratoire à l'Institut PASTEUR. Il nous a sans cesse aidé de ses conseils si précieux, et l'intérêt qu'il a porté à ce travail a été pour nous un encouragement constant.

Qu'il veuille bien accepter l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre respectueux dévouement.

A Monsieur le Docteur D.G. DERVICHIAN

Chef du Service de Biophysique à
l'Institut PASTEUR,

qui nous a fait le grand honneur de
nous accueillir dans son laboratoire.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre respectueux dévouement.

A Monsieur le Docteur D. BOURCOIN

Docteur ès-Sciences,

Chargé de Recherches au C.N.R.S.,

qui par ses discussions et ses conseils nous fut d'un grand secours,

En témoignage de vive gratitude et de sincère amitié.

A MM. B. FESTY et J.Y. LE TALAER

A tous les membres de l'unité de Biochimie de l'Institut GUSTAVE ROUSSY pour l'aide amicale qu'ils nous ont apportée.

PRINCIPAUX SYMBOLES ET ABREVIATIONS UTILISES DANS CE TRAVAIL

| | |
|---|---|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ARN | Acide ribonucléique |
| DNase | Désoxyribonucléase |
| A,T,C,G | Nucléosides constitués à partir des bases suivantes : adénine, thymine, cytosine et guanine |
| Pu,Py | Nucléosides constitués à partir des bases puriques (Pu) ou pyrimidiques (Py) |
| PM | Poids moléculaire |
| $M_w$ | Masse moléculaire pondérée en poids |
| $P_w$ | Degré de polymérisation pondéré en poids |
| $R_G$ | Rayon de giration |
| $(\eta)$ | Viscosité intrinsèque |
| $\eta$ sp | Viscosité spécifique |
| $\eta$ red | Viscosité réduite |

Les tableaux, figures et équations sont numérotés par chapitre. Le deuxième chiffre est toujours la référence du chapitre correspondant.

# I N T R O D U C T I O N

" A la fin du siècle dernier, nous pensions avoir atteint par la cellule et la bactérie le dernier échelon de l'échelle organique, mais nous comprenons aujourd'hui que nous n'en étions qu'au pénultième. Cette fois nous ne pourrons guère douter que nous soyons au terme de l'analyse car à descendre plus bas nous rejoindrions la molécule inerte. " Jean ROSTAND.

Depuis quelques années, les sciences biologiques ont progressé avec une telle rapidité qu'elles sont devenues capables d'effectuer l'étude des mécanismes vitaux élémentaires au niveau de la molécule même. La "Biologie moléculaire" qui est la science "qui cherche à expliquer les fonctions biologiques en termes de structures moléculaires" (comme l'a définie PERUTZ, prix Nobel) naquit de cette évolution. L'enthousiasme, dès lors suscité, n'a pas cessé de grandir et déjà dès 1958 PERUTZ écrivait : "Si le rapide développement de la biologie moléculaire se poursuit ..... nous pourrons comprendre de plus en plus de fonctions fondamentales des systèmes vivants en terme d'interaction entre les molécules de structure connue, au grand bénéfice de la biologie et de la médecine.... les problèmes-clés sont la structure des acides nucléiques dont dépend la copie génétique et la synthèse des protéines et la structure des catalyseurs protéiques qui régissent l'activité métabolique."

La Biologie moléculaire devait principalement s'attacher à percer le mystère du code génétique. Les premières découvertes en montrant que l'information tout entière qui gouverne les êtres vivants se cachait derrière la structure des acides nucléiques allaient faire de ces molécules, véritables "intelligentia" de la cellule, les principales protagonistes de la biologie contemporaine.

Le caractère général et donc la portée des résultats obtenus conférèrent rapidement à la biologie moléculaire la renommée que nous connaissons et attirèrent à elle, tel un puissant aimant des savants venus de tous les horizons. C'est ce que se plaisait à faire remarquer Kurt FELIX lors d'un récent congrès de biologie moléculaire :

" One of the most important finding of biochemistry is that many of the confusing differences between animals, plants, bacteria and viruses, disappear on the molecular level. It is at this level that physiologists, histologists,

biochemists, physicists, and biologists meet one another. Even the psychiatrists and philosophes could joint this meeting."

Il était évident que les toxicologues, dans cette atmosphère scientifique ne pouvaient attendre plus longtemps pour se joindre à cette assemblée. Il devenait alors de plus en plus évident que si l'on voulait comprendre la pleine signification du mécanisme d'une intoxication, il ne fallait plus s'attacher seulement aux lésions tissulaires et cellulaires, mais aussi et surtout aux lésions moléculaires.

Le terme de "toxicologie moléculaire" introduit pour la première fois par TRUHAUT (102) peut être défini de la même façon que PERUTZ définissait la biologie moléculaire. La toxicologie moléculaire serait la science qui cherche à expliquer en terme de structure moléculaire les actions toxiques. Cela pourrait donc comprendre aussi bien les efforts faits pour traduire la toxicité d'un corps en terme de structure moléculaire comme tente de le faire PULLMAN par exemple pour les carbures candérigènes que les efforts faits pour expliquer les effets toxiques en termes de relations moléculaires. Les structures de l'effecteur et du récepteur joueraient alors chacun un rôle complémentaire. Les pharmacologistes et les toxicologues avaient compris depuis longtemps l'importance de ces relations structurales. Dans quelques cas de structures simples, on avait déjà pu expliquer des activités pharmacodynamiques. C'était le cas par exemple pour les curares qui, ayant une structure suffisamment voisine de l'acétylcholine, sont capables d'inhiber de façon compétitive la cholinesterase. Mais, comme le rappelle VALETTE (103), nos connaissances sur la structure moléculaire fine étaient trop élémentaires jusqu'à ces dernières années, et il n'était pas possible de comprendre dans ces conditions les interactions moléculaires. Mais très récemment, les techniques modernes de la physique nous ont apporté des connaissances très précises sur ces structures. Pour couronner l'importance de ces résultats, les prix Nobel 1963 sont venus récompenser des chercheurs qui avaient élucidé des structures aussi complexes que celles des protéines et de l'acide désoxyribonucléique.

Ces résultats ouvraient la voie à de nombreuses études. L'une des voies les plus attirantes était sans doute l'étude de l'action des toxiques au niveau des acides désoxyribonucléiques, véritables détenteurs de toutes les informations

génétiques de la cellule. Déjà on avait pu montrer que pour un certain nombre de produits chimiques (mutagènes, actinomycine, alkylants ...) la toxicité était due essentiellement à l'interaction spécifique de ces produits avec l'acide désoxyribonucléique.

C'est pourquoi nous avons porté notre attention sur le problème des complexes nucléiques. Dans le permier chapitre de ce travail, en rappelant les quelques résultats très importants déjà obtenus dans ce domaine, nous expliquerons dans quelles conditions nous avons été amené à étudier les interactions entre l'ADN, le lysozyme, la quinacrine et le vert de méthyle. Puis nous rappellerons et discuterons deux techniques physico . chimiques : la diffusion de la lumière et la viscosimétrie qui permettant l'étude de la structure macromoléculaire des polymères en solution, nous permettront l'étude directe des complexes nucléiques. Puis nous montrerons comment une méthode enzymologique que nous avons établie et discutée permet à la fois de recueillir de nombreuses informations non seulement sur les modalités de la complexation de l'ADN mais aussi sur la structure même de cet ADN, en particulier sur sa structure primaire (séquence des bases dans la chaîne polynucléotidique).

# P R E M I E R E  P A R T I E

## PRESENTATION ET BUT DU TRAVAIL

* * * * *

# CHAPITRE I

## LES MACROMOLECULES ET LEURS COMPLEXES (1)

### A - GENERALITES SUR LES MACROMOLECULES ET LEURS COMPLEXES NATURELS : IMPORTANCE DES COMPLEXES MOLEIQUES -

Le terme de macromolécule englobe une très grande variété de composés naturels et synthétiques. Parmi les seules macromolécules naturelles, il en existe une infinité de variétés tant dans le monde végétal qu'animal. Selon une convention maintenant généralement admise, on peut définir une macromolécule comme une molécule constituée de 1000 atomes ou plus, représentant une unité de taille et de structure définies, dont tous les atomes sont liés par des liaisons de valence primaire.

On utilise aussi très souvent pour désigner ces molécules le terme de polymère qui désigne, comme l'indique son éthymologie, une molécule formée par l'enchaînement d'un grand nombre de sous-unités identiques ou différentes (monomères). Il existe donc théoriquement une différence dans la signification de ces deux mots, bien qu'ils soient généralement utilisés comme synonymes. Par exemple la paraldéhyde $(CH_3CHO)_3$ qui est un polymère ne saurait être considérée comme une macromolécule. Pour éviter cette ambiguïté, on utilise donc généralement le terme de haut polymère, dans le cas de polymère macromoléculaire.

Etant donné le nombre élevé d'atomes constituant ces molécules, il existe un nombre d'isomères remarquablement grand. Alors qu'il existe 2513 pentadécanes, il a été calculé par STAUDINGER qu'un polypeptide composé de 20 résidus d'acides aminés différents contenant C, H, O, N, S a pour un poids moléculaire de 2400 : 2,4 $10^{18}$ isomères possibles. Si l'on considère maintenant le cas d'une véritable macromolécule, une protéine d'un poids moléculaire de 120.000, le nombre des isomères possibles devient $10^{1268}$.

Si le nombre des macromolécules susceptibles d'exister est pratiquement infini, il est possible toutefois de classer les macromolécules naturelles en quatre types.

---

(1) Pour l'ensemble de ces problèmes on peut consulter les ouvrages de JIRGENSON (39) et EDSALL (26).

1°- Les polyprènes,

où les monomères sont des carbures, généralement isopréniques (caoutchouc)

2°- Les polysaccharides,

où les monomères sont des sucres (cellulose, amidon, etc...),

3°- Les protéines,

où les monomères sont les acides aminés naturels dont il existe 20 sortes différentes (albumine, enzymes etc...),

4°- Les acides nucléiques,

où les monomères sont des nucléotides (acide déoxyribonucléique : ADN et acide ribonucléique : ARN).

Toutes ces molécules se caractérisent, tant au point de vue physique que chimique et biologique, par un ensemble de propriétés remarquables.

Leurs dimensions sont généralement importantes mais varient toutefois considérablement d'une espèce à l'autre puisque l'on trouve des polypeptides de poids moléculaire 4000 et des acides nucléiques d'un poids moléculaire de plusieurs millions (160 $10^6$ dans le cas de l'ADN de certains bactériophages).

Pour certaines préparations de macromolécules naturelles les acides nucléiques par exemple, il existe, sans que l'on puisse dire s'il s'agit d'un artefact de préparation ou d'une réalité biologique, une dispersion des poids moléculaires, c'est-à-dire que toutes ces molécules de la même préparation et de la même espèce n'ont pas le même poids moléculaire. Il est donc nécessaire pour définir ces molécules de déterminer un poids moléculaire moyen. Selon la façon dont est calculée la moyenne, on distingue :

- le poids moléculaire pondéré en nombre :

$$\overline{M}_n = \frac{\sum i\ n_i\ M_i}{\sum i\ n_i}$$

où $n_i$ est le nombre de molécules dont le poids moléculaire est $M_i$. Cette moyenne moléculaire est obtenue directement par les méthodes de

---

N.B.- Dans le cas des polymères biologiques contenant une information, les monomères constituant la macromolécule sont de nature chimique différente. Il existe vingt sortes d'acide aminé différent et en première approximation quatre sortes de nucléotide dans l'ADN. C'est dans le mode de disposition de ces monomères sur la chaine moléculaire, c'est-à-dire dans la séquence de ces unités qu'est contenue l'information de la molécule.

détermination des masses moléculaires qui reviennent, en définitive, à compter le nombre de macromolécules contenues dans une masse connue du composé macromoléculaire. Elle est notamment donnée par les mesures de pression osmotique et les méthodes chimiques de dosage des groupes terminaux des chaînes macromoléculaires.

- le poids moléculaire pondéré "en poids" :

$$\overline{M}_W = \frac{\sum i \, n_i \, M_i^2}{\sum i \, n_i \, M_i}$$

Cette moyenne est donnée par les méthodes de diffusion de la lumière.

Les mesures d'ultracentrifugation et de viscosité conduisent à des moyennes qui sont encore différentes. Nous aurons l'occasion à propos de la description de ces méthodes de revenir sur la définition de ces moyennes.

Les solutions de ces molécules dont les dimensions sont si grandes ont des propriétés bien particulières qui s'apparentent très souvent à ce qu'il est convenu d'appeler les propriétés colloïdales. Nous aurons l'occasion dans ce travail d'étudier en détail quelques unes de ces propriétés.

De par leurs formes, ces macromolécules peuvent être rangées en deux classes, celles de forme globulaire et celles de forme fibreuse. Ces deux classes diffèrent par leurs propriétés mécaniques, leur solubilité et leurs propriétés hydrodynamiques. Sur le plan biologique à l'inverse des molécules fibreuses toutes les molécules globulaires sont très actives métaboliquement et ont un renouvellement rapide. Ce sont des vecteurs importants des réactions biologiques.

| Globulaire | Fibreuses |
|---|---|
| glycogène | cellulose |
| hémoglobine | collagène |
| albumine | caoutchouc |
| enzymes | acides nucléiques |

Les macromolécules fibreuses sont généralement flexibles et peuvent se pelotonner de différentes façons. Alors que la configuration des macromolécules globulaires est bien définie et souvent caractéristique du pouvoir biologique, celle des macromolécules fibreuses peut varier sans affecter leurs propriétés biologiques.

Du point de vue de leur rôle biologique, les macromolécules naturelles peuvent être rangées en deux classes. Dans la première nous distinguerons celles qui ne détiennent aucune information spécifique et dont les rôles sont divers et souvent secondaires. Rôle de soutien (cellulose) de réserve (glycogène) etc... Dans la seconde classe, nous rangerons celles qui détiennent une information spécifique. La quantité d'information contenue dans une molécule dépendant de ses dimensions, l'information cellulaire ne pouvait donc être conservée que dans des macromolécules. Parmi ces molécules, nous distinguerons :

- les molécules informantes, c'est-à-dire, celles qui conservent l'information et ne la livrent qu'au moment opportun. Ce sont les acides nucléiques.

- les molécules informées, c'est-à-dire, celles qui ont reçu une information et qui vont s'en servir pour assurer les différents mécanismes vitaux. Ce sont principalement les protéines et les enzymes. Le rôle de ces molécules est donc fondamental, et la vie est un équilibre dépendant du jeu harmonieux de ces molécules. Toute perturbation à ce niveau entraîne obligatoirement des conséquences dramatiques. C'est le cas par exemple au cours de l'infection virale qui peut être considérée en quelque sorte comme un "brouillage" et un"parasitage" de l'information normale. Il est probable que ce soit à ce niveau que la transformation maligne ait lieu également.

L'interaction de ces molécules entre elles est de plus à la base de nombreux mécanismes vitaux. La formation de complexes entre ces molécules a déjà rendu compte d'un grand nombre de phénomènes. C'est le cas par exemple des complexes protéines-protéines (réactions antigènes-anticorps, enzymes-substrat, etc...).

Les complexes nucléiques sont restés jusqu'à maintenant plus mystérieux et l'on commence seulement à entrevoir leur importance. C'est le cas par exemple des complexes acides nucléiques-acides nucléiques (hybride ADN-ARN) et acide nucléique protéines (synthèse des protéines).

Complexes nucléoprotéiques naturels

A la tête des complexes nucléoprotéiques naturels se placent les désoxyribonucléoprotéines constitutives des chromosomes. L'ADN peut être lié à trois sortes de protéines qui sont les protamines, les histones, et les protéines dites résiduelles. A peu près rien n'est connu du rôle biologique de ces protéines.

Les protamines sont des protéines fortement basiques de faible poids moléculaire (2000 à 5000) que l'on rencontre dans le sperme et les testicules de poisson seulement. La composition en acide aminé varie avec l'espèce mais généralement ces protamines contiennent beaucoup de lysine et d'arginine et pratiquement pas de cystine de tryptophane et d'acide aspartique.

Les histones ressemblent aux protamines par beaucoup de leurs propriétés. Elles sont basiques, hétérogènes, dépourvues de cystéine cystine et tryptophane. Leur poids moléculaire est plus élevé et leur point isoélectrique voisin de 10 et 11. Elles se rencontrent dans la plupart des tissus animaux.

Les protamines et les histones sont liées à l'ADN par des liaisons ioniques. Les nucléoprotéines se dissocient donc dans les solutions de concentration saline élevée.

Bien que pondéralement peu importantes, les protéines résiduelles ont certainement un rôle prépondérant. Ce sont des protéines très différentes des histones et des protamines par leur composition en acide aminé et qui sont très souvent acides. Les liaisons entre ces protéines et les ADN sont donc d'un tout autre type. D'autre part ces protéines semblent jouer un rôle très important dans la structure des chromosomes. Ainsi, il a été démontré que les histones peuvent être extraites du noyau sans que l'aspect microscopique des chromosomes soit modifié, mais comme l'ont montré ALFREY MIRSKY et STERN (1) si les protéines résiduelles de ces chromosomes sans histones sont traitées par la trypsine, l'ADN est libéré et la structure du chromosome s'effondre. Quand cette préparation sans histone est traitée par la DNase, il ne reste du chromosome qu'une quantité de protéines pondéralement peu importante. Ainsi, la configuration morphologique du chromosome, telle qu'elle est vue au microscope, est due à la combinaison de l'ADN avec ces seules protéines dites résiduelles. Une fois que ces deux composants ont été séparés, ni la configuration, ni la combinaison originelle du chromosome ne peuvent être réformées. Ces protéines résiduelles sont d'autre part non seulement hétérogènes chimiquement mais

hétérogènes métaboliquement et elles se renouvellent plus rapidement que les histones, ce qui pourrait être significatif d'un rôle métabolique particulier.

Une autre classe particulièrement intéressante de complexes nucléiques naturels est formé par les phages et les virus.

Ce matériel plus simple a permis de faire de nombreuses études permettant de montrer l'importance relative de la partie protéique et nucléique. Le pouvoir infectieux des acides nucléiques purs, sans protéines, a été démontré pour la première fois sur l'ARN de la mosaïque du tabac par FRAENKEL-CONRATH (29). Il a démontré ainsi que la seule molécule d'acide nucléique était nécessaire et suffisante pour déclencher le processus infectieux. Les très célèbres expériences du même auteur sur les virus hybrides (un acide nucléique d'une souche combiné à l'acide nucléique d'une autre souche) ont montré que les protéines, dans ce cas, devaient jouer principalement un rôle immunologique et un rôle de protection et d'enveloppe facilitant la propagation de l'agent infectieux.

Depuis de nombreux autres acides nucléiques, tant ADN qu'ARN isolés de virus animaux ou végétaux, ont été également démontrés infectieux.

Les ribonucléoprotéines naturelles des cellules jouent également un rôle prépondérant. Les travaux récents sur la biosynthèse des protéines ont montré l'importance de la relation ARN protéine. En effet, il a été démontré qu'un ARN métaboliquement instable, dit ARN messager, synthétisé dans le noyau, transportait l'information au cytoplasme ou il organisait la synthèse des protéines spécifiques.

En résumé, il apparaît et spécialement chez les êtres pluri-cellulaires que le rôle des protéines dans les complexes nucléo-protéiques est encore presque totalement inconnu. Etant donné d'autre part l'importance considérable de ces complexes dans tous les mécanismes vitaux, et en particulier dans la reproduction, la compréhension des mécanismes d'interaction entre les protéines et les acides nucléiques permet d'aider considérablement à la compréhension de leur rôle biologique. C'est pour cela, qu'il nous a paru intéressant d'entreprendre l'étude de ces mécanismes avec une protéine parfaitement définie et cristallisée, le lysozyme, qui a d'autre part des caractéristiques chimiques et physiques voisines des protéines nucléaires. Nous verrons en particulier au cours de ce travail quelle est l'importance de traces de ces protéines, importance qui sera à rapprocher de l'influence des protéines résiduelles nucléaires.

B - SUBSTANCES SUSCEPTIBLES DE SE COMPLEXER AUX ACIDES NUCLEIQUES; INTERET POUR LA BIOLOGIE, LA TOXICOLOGIE ET LA PHARMACOLOGIE DE L'ETUDE DE CETTE COMPLEXATION. (45) (95)

En dehors des protéines nucléaires qui se complexent naturellement à l'ADN, il existe un certain nombre de produits qui sont également susceptibles de se combiner avec l'ADN.

Dans ces complexes, les liaisons ayant le plus souvent un caractère ionique, ces substances sont en général des composés basiques. Ce sont des cations métalliques tels que $Mg^{++}$ $Mn^{++}$ $Hg^{++}$ (111) (28) (6) (108) des produits organiques ayant des fonctions basiques dont les constantes de dissociation sont élevées, ammonium quaternaire (4), acide aminé basique (111), lysine, arginine, polypeptide, polylysine (28), streptomycine (18), polyamines spermidine spermine etc... (97) (66). Parmi toutes ces substances, les plus intéressantes à étudier du point de vue biologique sont celles pour lesquelles la faculté de se fixer sur les acides nucléiques peut être invoquée pour expliquer leurs propriétés biologiques toxicologiques et pharmacologiques.

L'actinomycine qui est un antibiotique à la fois doué de propriété cancérogènes, cancérostatiques et tératogènes forme avec l'ADN des complexes stables. Il a été démontré qu'il y avait une très forte probabilité pour que cette complexation de l'actinomycine avec l'ADN soit directement lié au mécanisme de son action biologique (48) (79).

Les acridines sont doués de pouvoir mutagène, car elles sont susceptibles de se fixer sur la molécule d'ADN in vivo. La molécule de colorant s'intercale, comme l'ont montré les mesures de diffusion des rayons X faites par LUZZATI et coll. (65), entre les deux chaines de la molécule d'ADN et forme ainsi des complexes dit "complexes en sandwich". La déformation produite dans la molécule d'ADN au point de fixation de l'acridine est responsable de l'erreur commise lors de l'expression du code génétique.

De même le pouvoir antimalarique de la quinacrine ou de la chloroquine (KURNICK, 58) ou de la lomidine (LAUNOY, GUILLOT, SONCHERE, 59) (PILLE, 71, semble également relié à la propriété qu'ont ces substances de se complexer à l'ADN ou aux DNP.

Récemment, il a été également suggéré par LIQUORI et coll. (61) PULLMAN (76) que les carbures cancérigènes formaient avec l'ADN des complexes en sandwich.

Mais dans ce domaine, les recherches sont trop récentes pour que l'on puisse dire si la faculté pour ces carbures de se lier à l'ADN est en relation directe avec leur pouvoir cancérigène. Toutefois, il est remarquable de constater que pour de nombre ses substances cancérigènes, les mécanismes évoqués pour expliquer leurs propriétés fassent intervenir l'ADN.

En résumé, il apparaît donc à la lumière de ces faits que l'étude de l'interaction de tous ces corps avec l'ADN constitue dans le cadre de la toxicologie moléculaire, une voie de recherche particulièrement intéressante. C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude de l'interaction de la quinacrine et du vert de méthyle avec l'ADN.

Ces deux corps sont particulièrement intéressants, car ils forment, comme nous le démontrerons, des complexes qui ne sont pas attaquables par la DNase. D'autre part, la quinacrine possède de très remarquables propriétés. Elle est en effet capable de prévenir l'apparition du phénomène L.E. dans le lupus érythémateux DUBOIS (25) qui est provoqué par une dépolymérisation partielle de l'ADN nucléaire des cellules sanguines, l'invulnérabilité de ce complexe quinacrine - ADN à la DNase permettrait donc d'expliquer les effets thérapeutiques de cette drogue.

## C - MOYENS D'ETUDE DES COMPLEXES NUCLEIQUES

### a) Etude physico-chimique directe

La formation d'un complexe entre deux corps A et B peut être schématisé simplement

$$A + B \rightleftharpoons (AB)$$

Si (AB) est insoluble, l'analyse du précipité permet de mettre immédiatement en évidence ce complexe, et d'étudier rapidement et quantitativement la réaction d'équilibre dans les différentes conditions physico-chimiques (pH, force ionique etc...). Lorsque (AB) est soluble, il faut pour le mettre en évidence, soit le séparer puis le caractériser, soit le caractériser directement dans la solution par ses propriétés. Dans le premier cas, différentes méthodes de séparation peuvent être utilisées, telles l'ultracentrifugation, l'électrophorèse,l'ultrafiltration, la dialyse, etc... Dans le second cas, les méthodes qui permettent de mettre en évidence (AB) sont variées, ce sont par exemple l'analyse du spectre d'absorption de la lumière visible ou ultraviolette,

l'analyse du spectre de fluorescence ou l'étude des modifications des propriétés physico-chimiques de la solution, diffusion de la lumière, viscosité, etc...

C'est à ces deux dernières méthodes que nous nous attacherons principalement car, elles permettent de recueillir de nombreuses informations sur la structure macromoléculaire du complexe formé.

b) Etude enzymologique indirecte

Le principe de cette méthode, telle que nous l'avons imaginée, repose sur les principes suivants :

Lorsqu'un site enzymatique du substrat est occupé par une molécule fixée à cet endroit, l'enzyme ne pourra plus se fixer et la réaction enzymatique sera inhibée. L'étude de la cinétique de la réaction permet de calculer comme nous le verrons, le nombre de sites occupés, le nombre et la taille de ces sites.

Dans le cas de l'ADN, pour effectuer une telle étude, il est nécessaire de mesurer avec précision la cinétique de dégradation de la molécule et donc le nombre de coupures apparaissant dans la molécule. Nous avons donc été amené pour cette raison à effectuer au préalable une étude théorique et expérimentale pour calculer à partir des résultats obtenus en viscosimétrie, le nombre de liaisons phosphodiester hydrolysées dans la molécule d'ADN.

# D E U X I E M E  P A R T I E

## ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DIRECTE DES COMPLEXES NUCLEIQUES

Au cours de cette deuxième partie, après avoir donné les caractéristiques des produits que nous utiliserons, et rappelé les procédés employés pour la préparation de l'ADN, ainsi que les différents tests et contrôles à effectuer pour s'assurer de la qualité de la préparation, nous exposeront ce que l'on sait actuellement de la structure de l'ADN.

En particulier nous insisterons sur les méthodes qui ont permis d'aborder le problème de la détermination de la séquence des bases. Nous comparerons les résultats obtenus par les différentes méthodes. En particulier, nous serons amené à calculer la fréquence d'un type de séquence déterminé (Pu Py) que nous essaierons au cours de ce travail de déterminer par une méthode originale. Puis nous décrirons les méthodes de diffusion de la lumière et de viscosité permettant l'étude des macromolécules en solution. Puis nous verrons au cours de l'étude de la complexation de l'ADN et du lysozyme quels sont les services que peuvent rendre ces méthodes dans l'étude de la formation des complexes nucléiques.

# C H A P I T R E  I I

## PREPARATION ET CARACTERISTIQUES DES PRODUITS UTILISES

### I - PREPARATION DE L'ADN

A l'intérieur des noyaux cellulaires, l'ADN se trouve complexé à des protéines fortement basiques, histones ou protamines. Les nucléoprotéines, après rupture des parois cellulaires peuvent être extraites en mettant à profit leur différence de solubilité. Les RNP sont solubles dans les solutions dont la concentration saline (ClNa) est voisine de 0,14 M. Les DNP sont insolubles dans ces conditions. Elles ne sont solubles que dans des solutions de très faible force ionique ($\leq$ 0,001 M). Elles forment alors des solutions très fortement visqueuses. En milieu de force ionique élevée (IM) les DNP sont solubles, mais le complexe nucléoprotéique est détruit. On a alors en solution deux types de molécules indépendantes, d'une part l'ADN et d'autre part les protéines plus ou moins dénaturées. En mettant à profit ces différences de solubilité, il est donc possible d'extraire spécifiquement l'une ou l'autre de ces nucléoprotéines.

Au cours de l'extraction, un soin particulier doit être pris pour éviter l'action des nucléases. Dans ce but, on ajoute généralement aux liqueurs extractives un inhibiteur de ces enzymes. Dans les conditions généralement employées, le citrate de sodium est actif.

Quelle que soit la méthode utilisée pour préparer l'ADN, les différentes opérations peuvent se résumer de la façon suivante :

1°- Extraction sélective de la DNP

2°- Dissociation de la DNP

3°- Déprotéinisation, c'est-à-dire élimination sélective des protéines.

4°- Purification de l'ADN principalement par précipitation alcoolique.

Les différentes méthodes utilisées pour la préparation de l'ADN se différencient principalement par le procédé utilisé pour la déprotéinisation.

Différentes méthodes sont utilisées.

1°- Déprotéinisation par les sels

A fortes concentrations salines (ClNa 4 M) les protéines accompagnant l'ADN précipitent alors que l'ADN reste en solution. Le précipité de protéines obtenu, extrêmement fin, peut être séparé après filtration sur célite par exemple. Ce procédé est utilisé dans la méthode de SIGNER et SCHWANDER (85) (88).

2°- Déprotéinisation par le chloroforme - Méthode de SEVAG (86)

Lorsqu'on agite une solution aqueuse de protéines avec du chloroforme, on observe après séparation des deux phases un film protéique à l'interface. Les protéines en se dénaturant se sont insolubilisées, car les groupements hydrophiles se sont orientés dans la phase aqueuse et les groupements hydrophobes se sont orientés dans la phase chloroformique. Une solution aqueuse ainsi agitée plusieurs fois avec du chloroforme peut être presque totalement privée de protéines.

3°- Déprotéinisation par les détergents - Méthode de KAY et coll. (49)

Les détergents anioniques tels que le dodécyl sulfate précipitent les protéines de leur solution et sont sans effet sur l'ADN. Le précipité obtenu après traitement par ces détergents peut facilement être éliminé par centrifugation par exemple. Lorsque, par ce procédé, les protéines auront été éliminées, il sera facile d'éliminer le détergent en le faisant floculer dans des solutions salines concentrées. La précipitation alcoolique achèvera la purification.

4°- Déprotéinisation par les enzymes protéolytiques

Les protéines contaminant les solutions d'ADN peuvent être éliminées sélectivement après hydrolyse enzymatique. Les enzymes les plus couramment utilisées sont la chymotrypsine (14), la papaïne (5).

5°- Déprotéinisation par le phénol (51)

L'utilisation du phénol dans la préparation de l'ADN repose sur un principe un peu différent.

En milieu acide, si l'on agite une suspension tissulaire avec un mélange phénol eau, le phénol libère l'ARN qui passe dans la phase aqueuse. Les DNP et les protéines sont précipitées et se rassemblent à l'interface.

En milieu légèrement acide (pH = 6,35) et en présence de certains anions organiques (p. aminosalycilate de Na), le phénol libère à la fois l'ARN et l'ADN qui passent dans la phase aqueuse. Ceci se produit également lorsque l'on utilise

le phénol en milieu alcalin pH 9. Dans cette méthode la rupture des parois cellulaires, l'extraction et la dissociation de la nucléoprotéine se font donc simultanément. La principale difficulté de cette méthode consiste à éliminer l'ARN des solutions d'ADN. Les principaux moyens utilisables sont l'attaque spécifique par la DNase ou la précipitation sélective par les 2 methoxyéthanol.

Purification de l'ADN

Pour purifier l'ADN on utilise la précipitation alcoolique. Les solutions qui doivent être suffisamment concentrées en ADN (de 1 à 2 mg/ml) et en sel (ClNa M) sont traitées par deux fois leur volume d'alcool. Ce traitement se fera de préférence à froid (4°C). L'ADN se rassemble alors en fibres qui sont lavées dans l'alcool absolu puis séchées. Ces fibres peuvent être redissoutes et la précipitation de l'ADN recommencée. Ces traitements sont poursuivis jusqu'à ce que le degré de pureté de l'ADN désiré soit atteint.

## II - CONTROLE ANALYTIQUE DES PREPARATIONS D'ADN

Tous les biochimistes préparant et utilisant l'ADN ont essayé par des tests analytiques de contrôler la qualité de leur préparation. Les contrôles sont effectués selon deux directions différentes :

1°- soit qu'il s'agisse de doser la quantité d'ADN dans une préparation.

2°- soit qu'il s'agisse d'évaluer sa qualité soit d'un point de vue chimique (dosage des impuretés) soit d'un point de vue biologique. Dans ce dernier cas, il faut contrôler, si au cours de la préparation, la molécule a conservé ses propriétés biologiques. Ce contrôle n'est possible que pour certains ADN, bactériens ou viraux dont on sait mettre en évidence les propriétés biologiques. Cependant on a tenté dans ce cas de relier quantitativement l'activité biologique d'un ADN à ses propriétés chimiques et physiques puis par extrapolation, à défaut de test plus spécifique de considérer que lorsque une préparation d'ADN quelconque a les propriétés chimiques et physiques d'un ADN biologiquement actif, cet ADN peut être considéré comme satisfaisant. Ces tests, bien que s'étant montrés très utiles dans la pratique, sont certainement insuffisants. Dans un cas en effet, des ADN biologiquement inactifs, obtenus à partir d'ADN eux biologiquement actif par la méthode de synthèse enzymatique de KORNBERG (52) et devant donc théoriquement être doués de propriétés biologiques identiques ont montré cependant des propriétés physiques et chimiques satisfaisantes. Ceci montre que

ces tests physiques et chimiques ne peuvent pas être pris comme critère absolu démontrant la qualité d'une préparation.

Les principales impuretés pouvant contaminer une préparation d'ADN sont les protéines, l'ARN, les polysaccharides et certains sels métalliques.

Les principaux tests utilisés pour contrôler la qualité d'un ADN sont d'ordre physique. Ce sont principalement la détermination du poids moléculaire par diffusion de la lumière, des caractéristiques viscosimétriques (viscosité intrinsèque), de la constante de sédimentation et des caractéristiques optiques. Comme nous aurons l'occasion de revenir de façon très détaillée sur la détermination de certaines de ces caractéristiques physiques, nous ne nous intéresserons dans ce chapitre qu'à la détermination des caractéristiques optiques.

a) Dosage chimique de l'ADN

Ce dosage peut être effectué soit par dosage du désoxyribose (le plus spécifique car ce sucre n'est retrouvé que dans l'ADN, ses produits d'hydrolyse ou ses précurseurs) ou dosage de P (si la préparation est suffisamment pure, absence d'impuretés phosphorées protéines par exemple, ce dosage permet de doser valablement l'ADN).

- Dosage du désoxyribose (+)
  La méthode que nous avons utilisée est celle de K. BURTON (11) qui est une des plus sensibles. Elle permet de doser dans 1 ml de solution 10 µg d'ADN.

- Dosage du phosphore (+)
  Il est effectué après minéralisation avec l'acide sulfurique et le perhydrol par la méthode DRYER (24). Cette méthode permet de doser de 100 µg à 1000 µg d'ADN

b) Dosage physique de l'ADN

L'ADN possède un spectre caractéristique d'absorption de la lumière ultraviolette avec un maximum à 260 mµ , mais le coefficient d'extinction varie avec la qualité de l'ADN. Cette méthode qui en plus peut être faussée par des inter-

---

(+) Si ces déterminations sont faites directement sur les fibres d'ADN, il y a lieu de tenir compte de la quantité d'eau (qui varie de 20 à 30 %), contenue dans l'ADN sous cette forme. L'eau peut facilement être dosée par pesée avant et après chauffage à 105° C ou avant et après séchage sous vide phosphorique.

férences ne peut être employée en toute rigueur que lorsque l'on est sûr de la qualité de l'ADN ou que l'on a mesuré son coefficient d'extinction moléculaire. Nous reviendrons sur ce problème à propos du contrôle des propriétés optiques de l'ADN.

c) Dosage des impuretés dans l'ADN

- Dosage de l'ARN

Il est dosé selon la méthode de DEFRANCE et coll. (21) qui permet de doser jusqu'à 0,07 % d'ARN dans l'ADN.

- Dosage des protéines

Elles sont dosées par la méthode de LOWRY (64) qui permet de déceler environ 0,3 % de protéines dans l'ADN. L'ADN dénaturé, le phénol, le PAS pouvant interférer dans la réaction, il y aura lieu d'interpréter les résultats élevés avec beaucoup de prudence.

d) Contrôle des propriétés optiques

Le coefficient d'extinction molaire rapporté au phosphore $\varepsilon$ (P) est défini comme la densité optique à 260 m$\mu$ d'une solution qui contiendrait un atome-gramme de P nucléique par litre. Pour l'ADN natif, non dénaturé

$$\varepsilon (P) = 6600 \pm 200$$

densité optique d'une solution d'ADN à 10 $\mu$g/ml sera donc 0,212.

Si l'ADN est dénaturé $\varepsilon$ (P) augmente avec le nombre de liaisons hydrogènes rompues. Quand la dénaturation est totale $\varepsilon$ (P) a augmenté d'environ 40%. Cette augmentation de $\varepsilon$ (P) définit l'hyperchromicité. On conçoit aisément que plus l'hyperchromicité est élevée, plus le nombre de liaisons hydrogène intactes étaient grand dans la molécule initiale et moins l'ADN était dénaturé.

La mesure de $\varepsilon$ (P) et de l'hyperchromicité sont considérées à juste titre comme les tests à la fois les plus simples à effectuer et les plus informatifs sur l'état de dénaturation de la molécule.

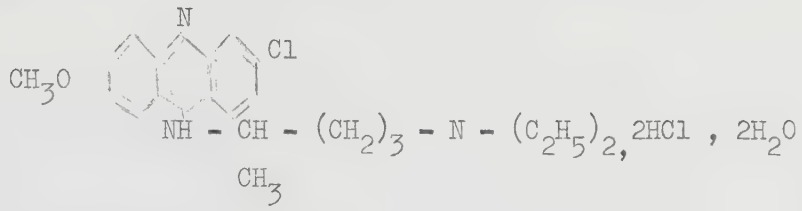
Sur le tableau nous avons rassemblé les caractéristiques chimiques et physiques théoriques ou considérées comme telles.

Les caractéristiques des échantillons d'ADN utilisés sont données avec les résultats expérimentaux qu'ils ont servi à établir.

Désoxyribonucléase

L'enzyme utilisée est préparée par WORTHINGTON à partir de panoréas de boeuf. Elle est trois fois cristallisée, son degré de pureté a été vérifié par RIOU (+) qui a montré par électrophorèse sur gel d'amidon que cette préparation était constituée de 4 fractions, la fraction principale représentant 80 % de la totalité.

QUINACRINE



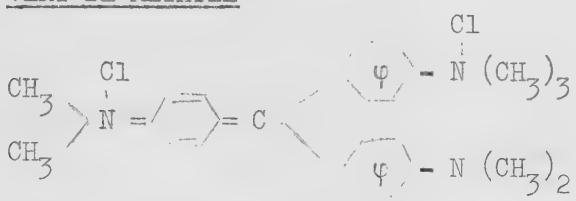

P.M. 509

Le coefficient molaire d'extinction est 8,5 à 424 mμ

7,9 à 430 mμ

Le colorant utilisé est fourni par Rhône Poulenc.

VERT DE METHYLE




P.M. 458,5

à pH 4,1 le coefficient molaire d'extinction à 635 mμ est

$$E_{635} = 74\ 400$$

Le colorant utilisé est fourni par MERCK.

Avant l'utilisation, il doit être purifié. En particulier le cristal violet qui contamine toujours les préparations de vert de méthyle doit être éliminé. Pour cela les solutions aqueuses de vert de méthyle sont extraites plusieurs fois par le chloroforme, les extractions sont poursuivies jusqu'à ce que la phase chloroformique demeure incolore. En général lorsque l'on part d'un colorant déjà très pur (Merck) trois ou quatre extractions sont suffisantes. Mais la plupart

- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

(+) Communication personnelle.

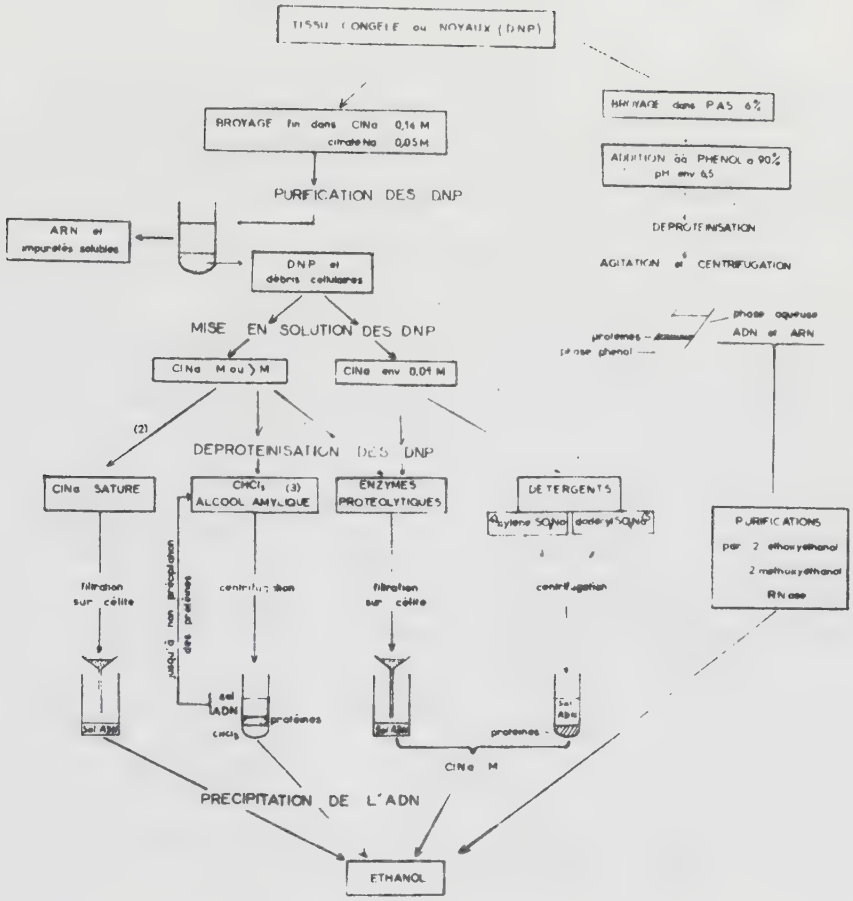
des préparations commerciales ne renferment pas plus de 50 % en poids de vert de méthyle. Un contrôle très soigneux de la concentration des solutions doit donc être fait avant leur utilisation, en particulier par détermination de l'extinction moléculaire à 635 mμ .

TABLEAU 1 II

CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES DE L'ADN

| Caractéristiques physiques : | | |
|---|---|---|
| P.M. | $5 - 8\ 10^6$ | |
| Rayon de giration A° | 2 400 - 3 000 | |
| Viscosité intrinsèque (η) CGS | 4 000 - 6 000 | |
| s Unité svedberg | 20 à 30 | |
| dn/dc (5 460 A°) (incrément d'indice de réfraction). | 0,170 | |
| **Caractéristiques chimiques :** | **Théorique (thymus de veau)** | **Généralement observée (+)** |
| $H_2O$ % | | 20 à 30 % |
| N % (poids sec.) | 16,7 | 14,9 |
| P " | 10 | 8,9 |
| N/P " | 1,67 | 1,67 |
| Protéines " | 0 | 0,3 à 2 |
| ADN " | 100 % | 89 % (+) |
| ARN " | 0 | 0 à 2 |
| Ribose " | 0 | - |
| Désoxyribose (poids sec.) | 46,2 | 38,5 |

(+) L'ADN précipité sous forme de fibres à partir de solution ClNa M contient de ce fait une proportion importante de ce sel.




PRINCIPALES METHODES DE PREPARATION DES DESOXYRIBONUCLEOPROTEINES ET DES ACIDES DESOXYRIBONUCLEIQUES
(D.N.P) A.D.N.

1. Méthode de KIRBY
2. " " SIGNER et SCHWANDER
3. Déprotéinisation suivant SEVAG
4. Méthode de SIMMONS CHAVOS et ORBACH
5. " " KAY - SIMMONS - DOUNCE

Figure 1 (II)

# C H A P I T R E III

## GENERALITES SUR LA STRUCTURE DE L'ADN

Après avoir rappelé la constitution chimique de l'ADN nous décrirons sa structure secondaire puis nous verrons quelles sont les méthodes qui permettent de déterminer la taille et la structure de cette molécule en solution. Nous aborderons alors le problème de la séquence des bases.

### I - COMPOSITION CHIMIQUE

Après hydrolyse chimique complète; on obtient trois sortes de composés en proportion équimolaire :

1°- des bases azotées

Elles dérivent toutes de deux bases organiques : la purine et la pyrymidine. Ce qui les fait classer en deux groupes bases puriques et bases pyrymidiques. Les formules de ces bases sont rassemblées sur la figure 1 III.

2°- un sucre : le D désoxy - 2 ribose

3°- l'acide phosphorique

- L'association d'une base et du sucre forme un nucléoside. La structure de ces nucléosides est représentée sur la figure 2 III.

- L'association d'un nucléoside et d'une molécule d'acide phosphorique forme un nucléotide. Il en existe deux sortes selon que le groupement hydroxyle estérifié sur le sucre se trouve en position 3' ou 5'. Par convention, lorsque la position de l'hydroxyle estérifié n'est pas précisée, il s'agit toujours d'un dérivé 5'.

La molécule d'ADN est formée par l'enchaînement de nombreux nucléotides. Elle peut donc être considérée comme un haut polymère biologique. Sur la chaîne polynucléotidique, les nucléotides sont reliés entre eux par des liaisons phosphoesters. Les fonctions hydroxyles estérifiées sont celles du sucre (3' ou 5'). Cette structure est schématisée sur la figure 2 III.

PRINCIPALES BASES AZOTEES DES ACIDES NUCLEIQUES
TROUVEES DANS LES TISSUS ANIMAUX

| NOYAU | SUBSTITUTIONS | BASES | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $R_2$ | $R_5$ | $R_6$ | Dans ADN et ARN | Dans ADN seulement | Dans ARN seulement |
| Purine | | | | $NH_2$ | Adénine (6-amino-purine | | |
| | | $NH_2$ | | OH | Guanine (2-amino-6-hydroxy-purine) | | |
| Pyrimidine (*) | | | | $NH_2$ | Cytosine (2hydroxy-6aminopyrimidine) | | |
| | | | | OH | | | Uracile (2.6-dihydroxypyrimidine) |
| | | | $CH_3$ | OH | | Thymine (5méthyl-uracile) | |

(*) Certains auteurs, se référant aux Chemical Abstracts, numérotent les sommets de ce cycle de la façon suivante

Nous préférons l'autre système, plus ancien, qui laisse subsister une analogie entre bases puriques et pyrimidiques

Figure 1 (III)

Conventionnellement, les chaînes polynucléotidiques peuvent être écrites de façon abrégée de la manière suivante :

Les lettres A, T, G, C représentent les nucléosides constitués à partir de bases suivantes: adénine, thymine guanine et cytosine. La lettre p représente la molécule d'acide phosphorique. Si p est situé à droite de la lettre initiale symbole du nucléoside, cela signifie que c'est l'hydroxyle 3' du sucre qui est estérifié tandis que si p est situé à gauche c'est l'hydroxyle situé en 5'. Lorsque une ambiguité avec les polynucléotides à base de ribose est possible, la lettre D écrite en premier montre qu'il s'agit bien de polynucléotides désoxyribonucléotidiques. Un exemple de cette représentation est représenté sur la figure 2 III.

Cette convention d'écriture est en pratique admise par tous les biochimistes et en particulier elle est recommandée par "The Journal of Biological Chemistry".

## II - STRUCTURE SECONDAIRE - MODELE DE WATSON ET CRICK

### A - Etude par diffraction des rayons X

Les meilleurs clichés obtenus par cette méthode proviennent d'ADN préparés par la méthode de SIGNER et SCHWANDER (85) (88). Les premières études datent de 1938.

ASTBURY et BELL (3) montrent qu'il existe le long de la fibre un espacement régulier de 3,4 A°. Ils émrttent l'hypothèse d'un entassement régulier de nucléotides distant de 3,4 A° et n'excluent pas la possibilité que les nucléotides soient disposés en spirale le long de l'axe de la molécule.

PAULING et COREY (68) à la suite de leurs travaux sur les protéines où ils démontrent une structure hélicoïdale, essaient d'appliquer cette structure à l'ADN.

Ils proposent un schéma où deux chaînes polynucléotidiques s'enroulent autour d'un axe. Les groupements phosphates sont dirigés vers l'axe et les bases vers l'extérieur. Mais ce schéma ne rend pas compte d'un certain nombre de propriétés de l'ADN (courbes d'électrotitration, facilité d'accès des ions aux groupements phosphates etc...).

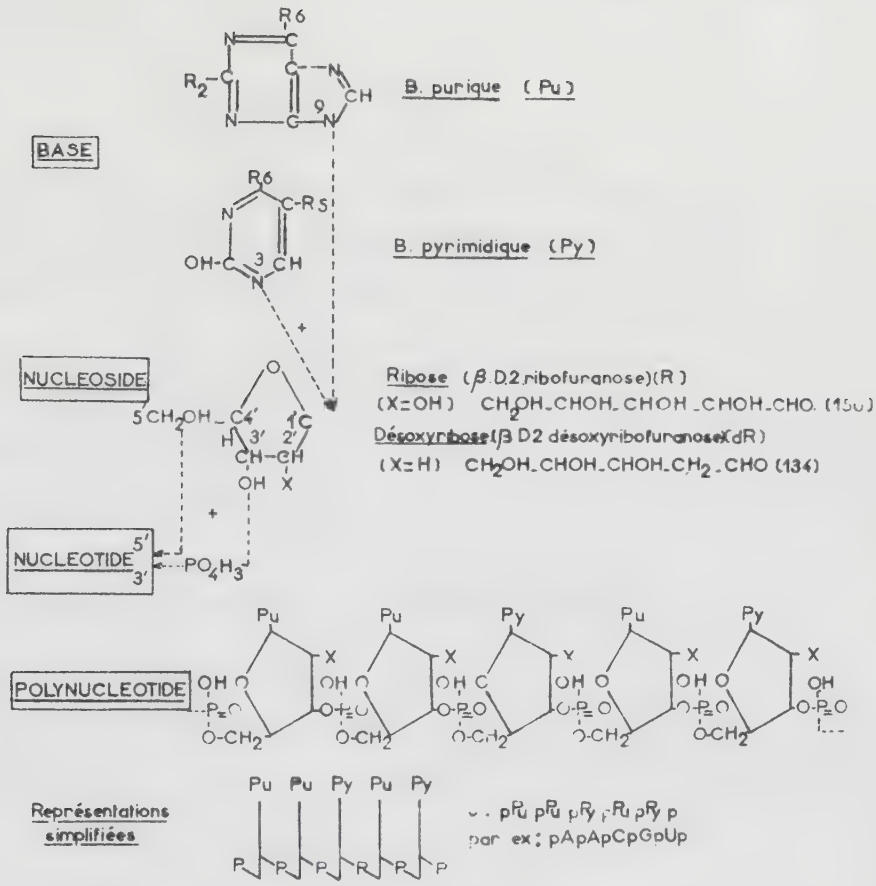



Figure 2 (III)

Structure des nucléosides, nucléotides et polynucléotides.

Représentation schématique.

WATSON et CRICK (104) (105) propcsent alors le schéma suivant figure (3 III). Deux chaînes polynucléotidiques enroulées autour d'un axe les groupes phosphates à l'extérieur, les bases à l'intérieur. Ces bases sont appariées entre elles par des liaisons hydrogènes.

Adénine avec thymine
Guanine avec cytosine

Alors que l'adénine et la guanine n'échangent que deux liaisons H, il semble que la guanine et la cytosine en échangent trois (figure 4 III). Ceci expliquerait en particulier la plus grande stabilité des ADN riches en paires guanine cytosine.

La polarité des deux chaînes est différente. Si sur une chaîne les groupements phosphodiesters s'enchaînent de la façon suivante : 3' 5', 3' 5', 3' 5', sur la chaîne opposée l'enchaînement sera : 5' 3', 5' 3', 5' 3', (figure 5 III).

B - Démonstration analytique du modèle de WATSON et CRICK

1°- Cinétique d'action de la DNase, SCHUMAKER et coll. (84)

La DNase pancréatique rompt une seule liaison internucléotidique à la fois. La vitesse avec laquelle la taille des molécules diminue lorsqu'on fait agir la DNase sera différente s'il y a une chaîne ou deux.

Dans le cas d'une seule chaîne chaque coupure est efficace et le poids moléculaire de la particule diminue très rapidement. Dans le cas d'une structure à deux chaînes du type WATSON et CRICK, il faut qu'il y ait coupure sur les deux chaînes simultanément, les liaisons hydrogènes entre les deux chaînes suffisant à maintenir la structure. De plus, il faut que ces coupures soient l'une en face de l'autre.

On peut alors calculer théoriquement quelle serait la vitesse de dégradation de l'ADN sous l'effet de la DNase dans le cas où cette molécule serait formée d'une seule chaîne ou de deux chaînes.

Dans le cas de l'ADN, les résultats expérimentaux sont en accord avec un modèle à deux chaînes. Nous aurons l'occasion de revenir plus en détail sur ce problème.

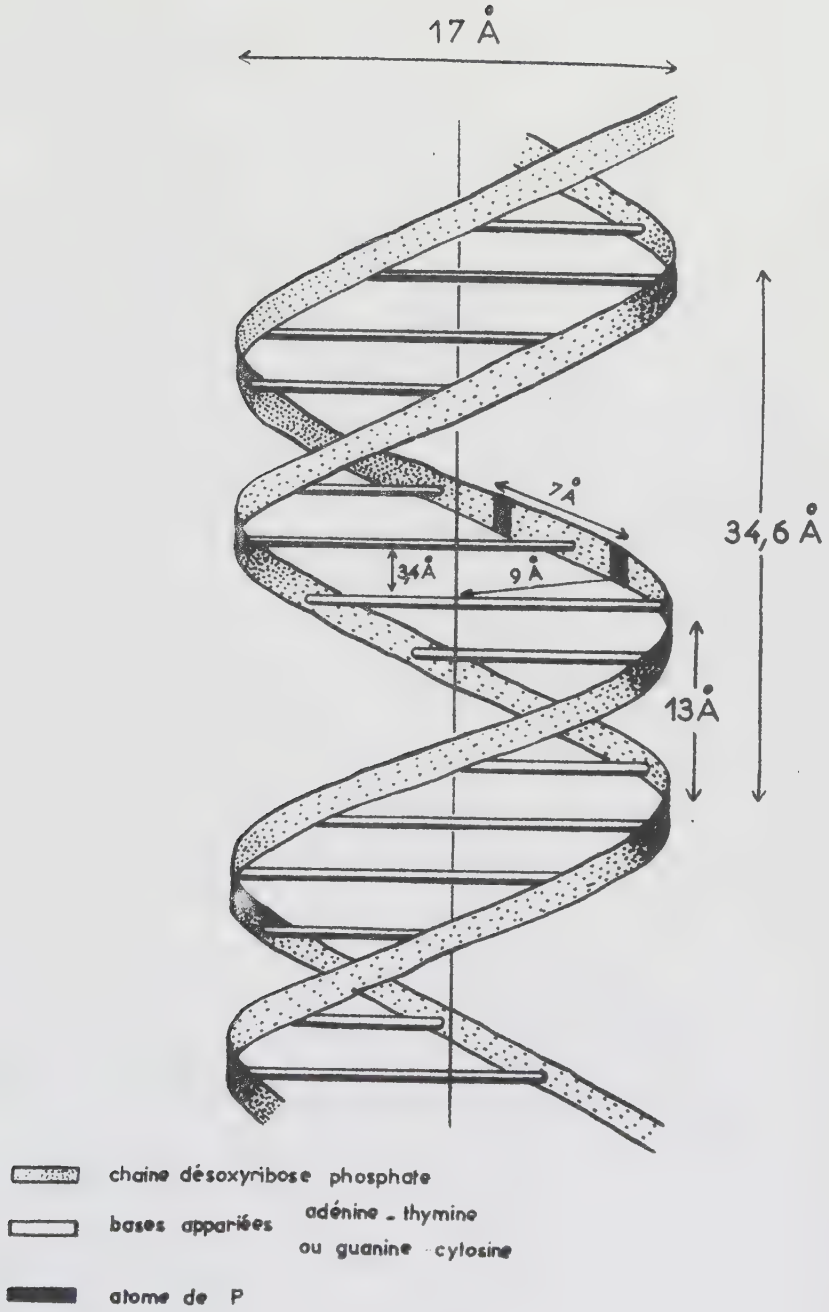
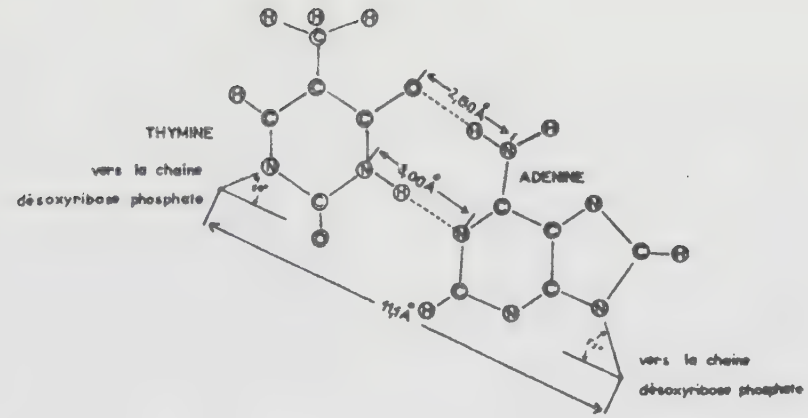
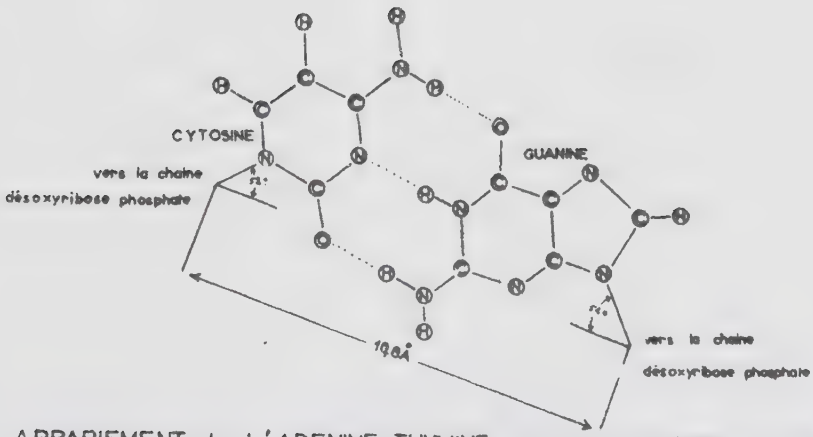



Figure 3 (III)

Structure de l'ADN selon WATSON et CRICK




APPARIEMENT de L'ADENINE_THYMINE et de la GUANINE_CYTOSINE

Figure 4 (III)

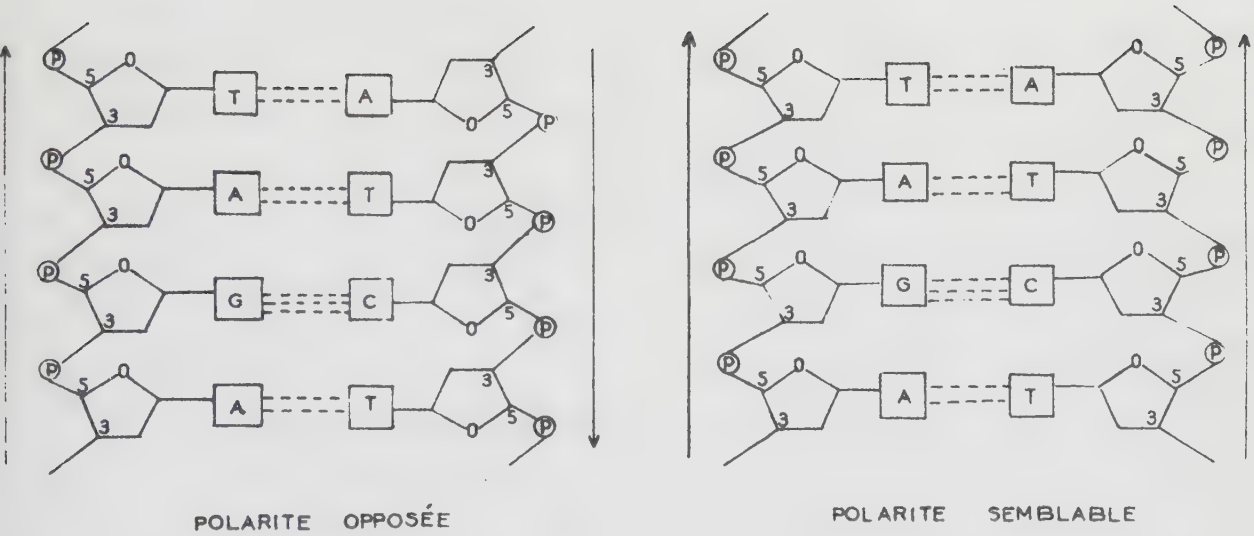



Figure 5 (III)

Représentation schématique de deux chaînes nucléotidiques appariées et dont la polarité Est soit opposée ou semblable.

WILKINS (106) à partir du modèle décrit par WATSON et CRICK calcule quelles devraient être les valeurs observées dans les expériences de diffraction de Rayon X. Les valeurs théoriques ainsi calculées bien que proches des valeurs observées conduisent WILKINS et ses collaborateurs à modifier dans le détail et à perfectionner la structure de WATSON et CRICK, par approximations successives.

De plus, ils étudient l'influence de la concentration en eau de l'ADN sur sa structure. Ils décrivent deux structures dites A et B correspondant respectivement à des humidités relatives de 75 et 95 %. B étant stable dans des grands domaines $A \rightleftharpoons B$, le passage de la structure A à B étant reversible.

Les études furent poursuivies de préférence sur les sels de Li de l'ADN qui sont stables sous la forme B. De plus le lithium élément léger diffuse moins les rayons X que le Na.

Forme A :

- diamètre de l'hélice 18 A°
- pas de l'hélice 28 A°

11 nucléotides sur chaque chaîne pour un tour.

Les paires de bases forment un bâtonnet dont l'axe est incliné d'environ 65° sur l'axe de l'hélice et qui ne passe pas par l'axe.

Forme B :

- diamètre de l'hélice 31,1 A°
- nombre de nucléotides par tour = 10

Les paires de bases forment un bâtonnet dont l'axe est perpendiculaire à l'axe de l'hélice et qui passe par l'axe de la molécule (fig. 6 III).

2°- Electrotitration

Les courbes de titration par les acides et les bases de l'ADN ne sont pas superposables à l'aller et au retour comme le laisse prévoir la structure de WATSON et CRICK figure 7 III.

En effet, les groupements NH et CO engagés dans des liaisons hydrogène s'ionisent aux pH extrêmes. Ces pH atteints, les liaisons H sont rompues, la molécule est dénaturée; ces groupements libérés interviennent alors au retour de la titration.

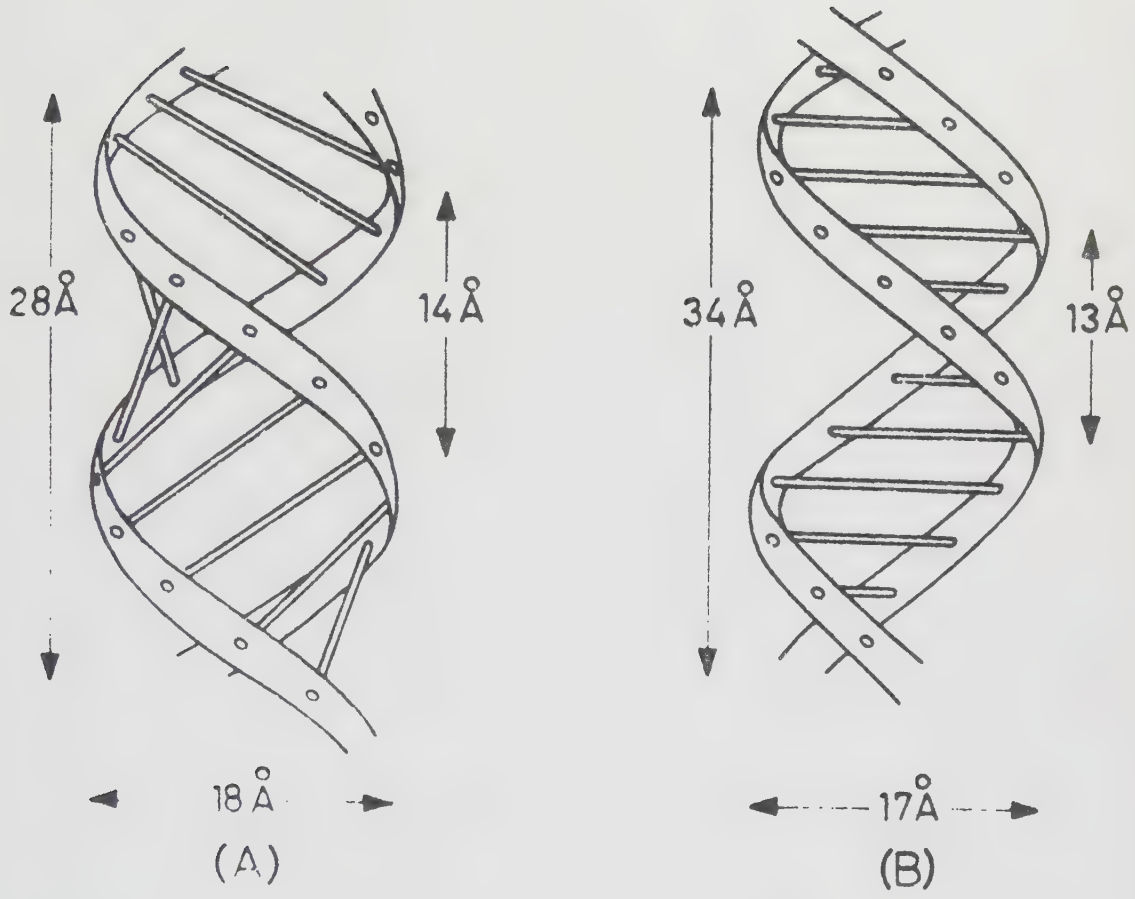
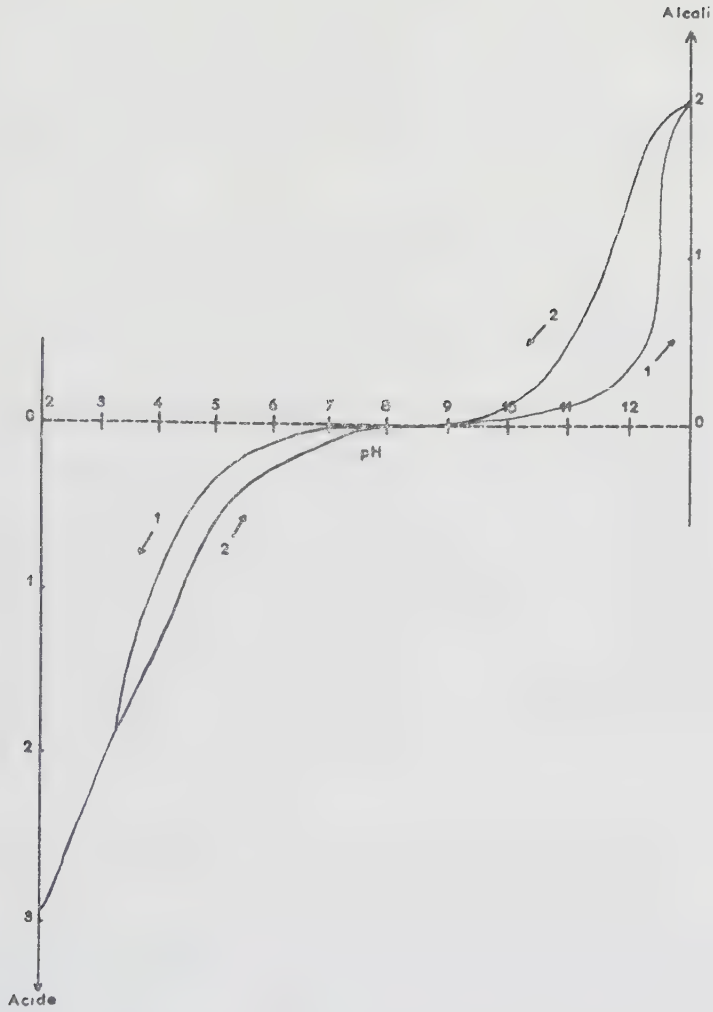



Figure 6 (III)

Structure A et B de l'ADN




COURBE DE TITRATION DU SEL SODIQUE D'UN ADN

LES RESULTATS SONT EXPRIMES EN EQUIVALENTS D'ACIDE OU D'ALCALI POUR 4 ATOMES DE P (correspondants à 4 bases)

1_ TITRATION A PARTIR DE LA NEUTRALITE

2_ TITRATION A PARTIR D UN pH ACIDE OU ALCALIN

FIGURE 7 (III)

3°- Analyse chimique-chromatographie des bases

Nous avons vu que les bases s'appariaient entre elles l'adénine avec la thymine et la cytosine avec la guanine. Pour confirmer le schéma de WATSON et CRICK on doit retrouver lors de l'analyse de la composition en base que les fractions molaires d'adénine et de thymine d'une part et celles de cytosine et de guanine d'autre part sont identiques; c'est-à-dire :

$$A=T \qquad C=G$$

$$A+G = C + T$$

Le rapport A + T / G + C est alors une caractéristique de l'ADN considéré.

4°- Données biologiques

De nombreux faits biologiques, en particulier la replication et la duplication semi-conservative de la molécule lors de la division cellulaire, ne peuvent s'interprèter qu'en admettant la structure de WATSON et CRICK. La grande originalité de cette structure lui a permis d'être extrêmement féconde. En particulier, elle a permis d'aborder dès maintenant sur des bases solides le problème du code génétique qui est sans aucun doute l'un des problèmes les plus importants de la biologie contemporaine.

## II - MODIFICATIONS POSSIBLES DU SCHEMA DE WATSON ET CRICK

DEKKER et SCHACHMAN (22) émettent l'hypothèse de coupures de la chaîne en certains endroits avec des groupements phosphoriques secondaires libres, hypothèse infirmée par les résultats d'électrotitration. Mais cette technique n'a pas permis jusqu'ici de doser plus d'un groupement phosphorique secondaire pour 50 groupements phosphates primaires.

BERNARDI (7) propose un schéma ressemblant à celui proposé par DEKKER et SCHACHMAN. L'ADN serait composé de sous unités susceptibles d'être libérées dans certaines conditions par attaque enzymatique.

- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

N.B. Récemment BROT et SZWARC (10) ont montré que les distances entre atomes dans la molécule d'ADN mesurées par la méthode de N.M.R. étaient compatibles avec le modèle de WATSON et CRICK.

ADN monohélicoïdal

Récemment SINSHEIMER (91) a isolé du phage ΦX 174 un ADN qui semblait très différent de par sa structure des autres ADN. Il a montré par des mesures de diffusion de la lumière, de vitesse d'action de la DNase, d'analyse chromatographique des bases que cet ADN était probablement constitué d'une seule chaîne polydésoxyribonucléotidique.

## IV - POLYMERISATION DES ADN - STRUCTURE EN SOLUTION

Les principales techniques utilisables pour cette étude sont : l'ultracentrifugation analytique, la diffusion de la lumière, la viscosimétrie, la birefringence d'écoulement. Les renseignements fournis sont le poids moléculaire, la taille des particules, ainsi que leur forme et leur configuration.

Ultracentrifugation

Cette méthode consiste à étudier le comportement des molécules dans une solution soumise à un champs centrifuge très élevé. On mesure la répartition des molécules à la suite de cet effet centrifuge si un équilibre est atteint, ou on mesure la vitesse de sédimentation des particules dans ce champ centrifuge. Le coefficient de sédimentation est alors défini :

$$s = \frac{dx/dt}{\omega^2 X}$$

X est la distance de la particule au centre de rotation, $\omega$ la vitesse angulaire, $\omega^2 X$ est donc l'accélération centrifuge. dx/dt est la vitesse prise par la particule sous l'effet de cette accélération centrifuge. Une particule qui aurait une constante de sédimentation de une unité C.G.S. serait donc une particule qui sédimenterait à la vitesse de 1cm/sec. sous l'effet d'une accélération centrifuge de 1cm/sec/sec. On utilise généralement une subdivision de cette unité, le svedberg qui est défini

$$\text{un svedberg (s)} = 10^{-13} \quad \text{u CGS}$$

Le coefficient de sédimentation d'une molécule d'ADN est généralement compris entre 20 et 30 S.

Pour mesurer le P.M. à partir de S il faudrait théoriquement connaître la constante de diffusion. Dans le cas de l'ADN cette valeur n'est pas accessible

avec suffisamment de précision pour pouvoir calculer le P.M. correctement. Toutefois à la suite d'études sur les fragments soniques de l'ADN DOTY et coll. (23) ont établi :

$$S^{\circ}_{20} = 0,063\ M^{0,37}$$

Diffusion de la lumière

Cette méthode, sur laquelle nous aurons l'occasion de revenir en détail permet de calculer directement le P.M. Toutes les autres méthodes ici citées ne permettent qu'une mesure indirecte. Les valeurs trouvées dans le cas de l'ADN sont généralement voisines de $6\ 10^6$ ce qui correspond approximativement à 20.000 nucléotides soit 10.000 sur chaque chaîne.

Cette méthode permet également de déterminer la forme de la molécule en solution. Les résultats conduisent à admettre pour la particule un modèle intermédiaire entre le bâtonnet et la pelote statistique. Ce serait un long filament rigide et ondulé. C'est d'ailleurs cette image de l'ADN que l'on observe au microscope électronique figure 8 III .

Viscosimétrie

Comme dans le cas de l'ultracentrifugation le P.M. ne peut pas être calculé directement à partir de la valeur de la viscosité intrinsèque. Nous reviendrons en détail sur ce problème mais nous pouvons signaler dès maintenant que comme pour l'ultracentrifugation, DOTY et coll. (23) ont établi une relation empirique entre la viscosité intrinsèque et le P.M.

$$(\eta) = 1,45 \times 10^{-4}\ M^{1,12}$$

La viscosité intrinsèque de l'ADN est généralement voisine de 5000 u CGS. Si la particule est assimilée à un ellipsoïde, le grand axe de cette ellipsoïde mesurerait 7.000 à 8.000 A°. Un résultat identique est trouvé par la birefringence d'écoulement.

## V - ALTERATIONS PROVOQUEES DE LA STRUCTURE DE L'ADN

Cette structure peut subir principalement deux sortes de modifications selon que :

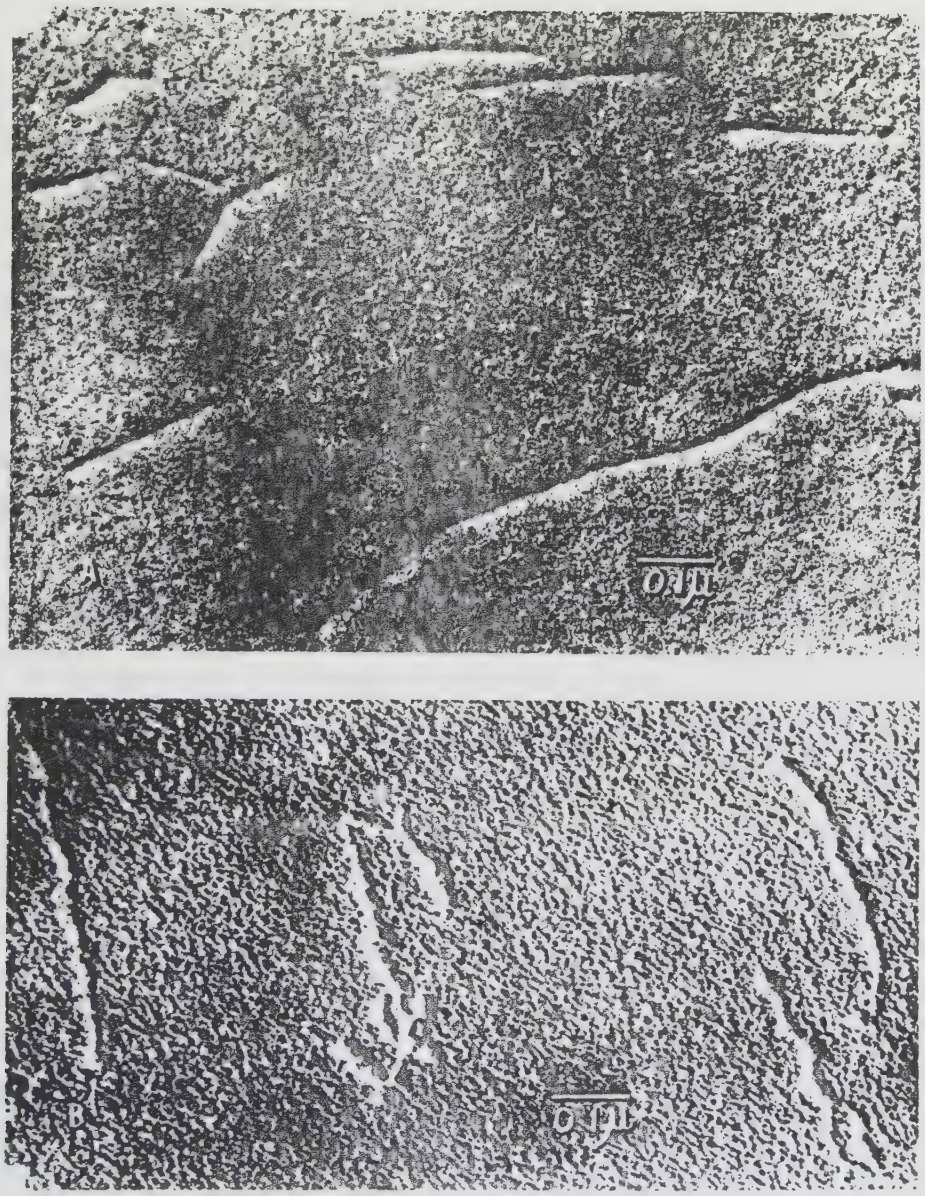



Figure 8 (III)

Photographie au microscope électronique, de particules d'ADN selon HALL (32)

1°- La structure primaire de la molécule est intéressée

Il y a rupture des liaisons internucléotidiques. On dit alors qu'il y a dégradation ou dépolymérisation. On observe alors une chute du P.M. Les principaux agents de dégradation sont les nucléases et les effets mécaniques (ultrasons).

2°- La structure secondaire est intéressée

Dans ce cas ce sont les liaisons hydrogènes qui sont rompues. On dit alors qu'il y a dénaturation. Dans certains cas, les deux chaînes nucléotidiques peuvent se séparer notamment sous l'effet d'une élévation de température. Au cours du refroidissement il y a généralement une renaturation, c'est-à-dire que les liaisons hydrogènes sont susceptibles de se réformer. Mais cette renaturation n'est que partielle. Au cours de la dénaturation la particule perd sa rigidité et se pelotonne sur elle-même (figure 9 III) la viscosité chute donc très brutalement. Le poids moléculaire peut ne pas être changé s'il y a eu renaturation même partielle. La taille de la particule comme l'exprime le rayon de giration est fortement diminuée. L'absorption de la lumière U.V. par les solutions d'ADN dénaturé augmente (effet hyperchromique).

Les facteurs de dénaturation sont multiples

- physiques élévation de température
- physico-chimiques pH extrêmes
- chimiques urée, cystéine, etc...

Ces deux phénomènes peuvent se superposer, c'est ainsi qu'une dépolymérisation DNasique importante s'accompagne toujours d'une dénaturation des produits de dégradation.

## VI - ANALYSE DE LA SEQUENCE DES BASES

Les problèmes posés par l'analyse des séquences et surtout l'intérêt de cette analyse ont été clairement définis par PERUTZ en ces termes :

"Nous ne savons pas dans quel ordre de succession les bases sont disposées dans chaque acide nucléique et aucune information directe ne nous permet d'affirmer qu'elles soient disposées dans un ordre défini; nous savons seulement que les proportions sont caractéristiques et constantes dans l'ADN d'une espèce donnée. Le fait que les bases soient les seuls constituants variables nous fait

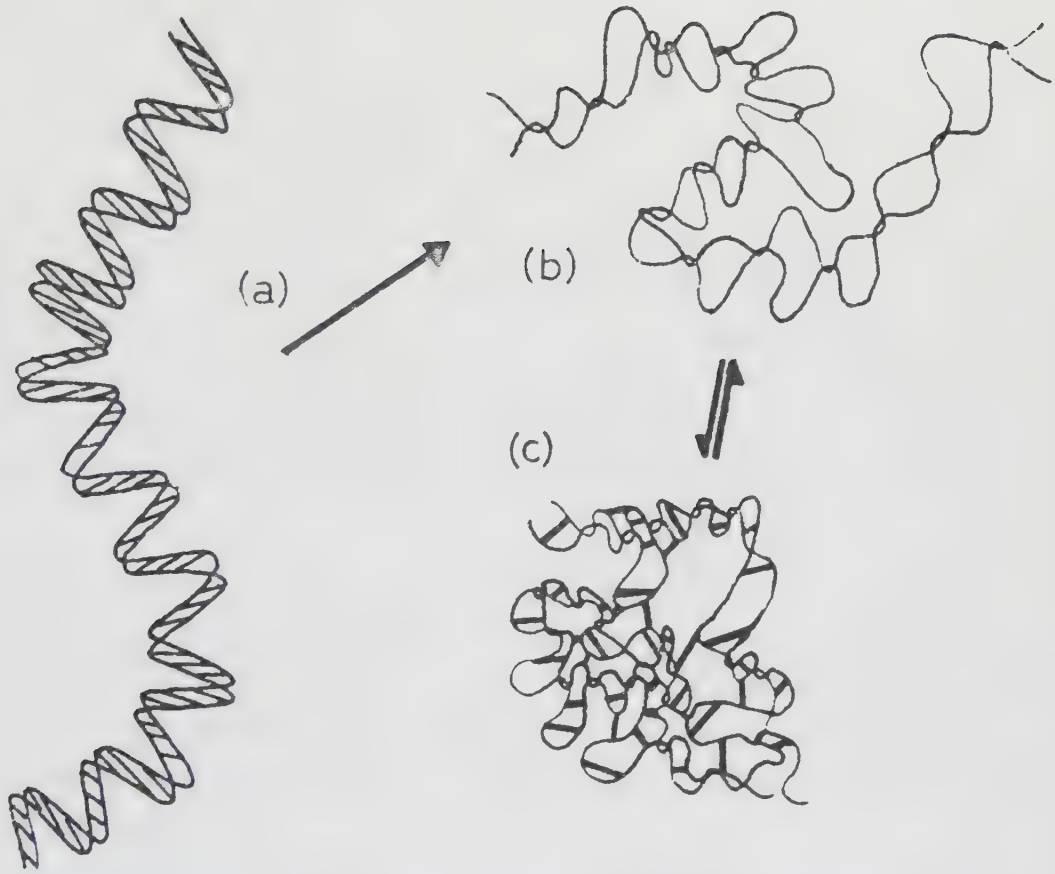



Figure 9 (III)

Représentation schématique de l'ADN natif et dénaturé selon JORDAN (44)

a) ADN natif

b) ADN dénaturé en milieu de faible force ionique

c) ADN dénaturé en milieu de force ionique élevée.

Le passage de la forme b) à la forme c) est parfaitement réversible.

croire qu'elles sont disposées dans un ordre défini, et que cet ordre constitue le code génétique. S'il en est ainsi, le langage génétique est écrit dans un alphabet à quatre lettres ..... Nous admettrons maintenant comme hypothèse de travail que la succession le long de la chaîne d'acide nucléique détermine la succession des acides aminés le long de la chaîne protéique et que c'est là l'objet réel du code génétique".

Il en résulte un très grand intérêt à déterminer ces séquences le long de la chaîne de la molécule d'acide désoxyribonucléique. Le problème est extrêmement complexe, et il n'existe aucune méthode générale pour le résoudre. La seule approche du problème qui ait été faite jusqu'à maintenant a consisté à estimer la répartition le long de la molécule de certaines séquences déterminées et à comparer la répartition observée avec une répartition qui suivrait les lois du hasard. Ces études ont abouti et ont montré que pour un ADN d'une espèce déterminée, cette répartition était constante et caractéristique de l'espèce considérée et de plus qu'elle était significativement différente d'une distribution statistique.

Une analyse plus approfondie se heurte dès maintenant à une incroyable difficulté. Les différentes préparations d'ADN, sont en réalité un mélange de différentes espèces moléculaires (plus de 5.000 chez les organismes supérieurs). Pour pouvoir analyser valablement les séquences, il faudrait donc auparavant séparer les différentes espèces moléculaires. On voit donc à quelles difficultés se heurte ce problème.

Les résultats mentionnés ci-dessus ont été obtenus par deux sortes de méthodes. L'une dite "détermination du plus proche voisin" JOSSE, KAISER et KONBERG (47) met à profit les propriétés des polymérases et des phosphodiesterases. L'autre vise à déterminer les séquences polypuriques et polypyrimidiques ($Pyp\ (Pup)_n\ Py...$ $Pup\ (Pyp)_n\ Pu...$ $\leqslant 1$ $n \leqslant 9$). Par suite de la structure de WATSON et CRICK (bases puriques = bases pyrymidiques) il y a complémentarité exacte entre ces deux types de séquences. Ce dernier type de méthode a été principalement exploité par JONES (40) (41) (42) (43) CHARGAFF (16) (87) (94) et BURTON (12) (13).

1°- <u>Méthode du plus proche voisin</u> (46) (47) (96)

KORNBERG (52) avait montré qu'in vitro en présence d'une faible quantité d'ADN dit ADN amorceur, des quatre 5' nucléosides triphosphates, d'un enzyme dit

polymérase et de $Mg^{++}$, il y avait synthèse d'ADN et que la quantité synthétisée atteignait jusqu'à 20 fois celle de l'ADN amorceur ajouté. L'ADN ainsi synthétisé avait toutes les caractéristiques physico-chimiques de l'ADN amorceur.

Si l'on marque au $^{32}P$ l'un des 5' nucléosidetriphosphate, sur le phosphate le plus près du sucre. (Soit Y ce précurseur marqué), au cours de la synthèse enzymatique Y se trouve incorporé dans la chaîne polynucléotidique (figure 10 III) à côté du nucléotide X. Si maintenant cet ADN nouvellement synthétisé est traité par une phosphodiesterase hydrolysant les liaisons 5' phosphates (phosphodiesterase de rate de mammifère par exemple) le $^{32}P$ sera retrouvé incorporé dans le nucléotide X. Chaque fois que l'on aura eu la séquence XpY on retrouvera un nucléotide X marqué. La mesure de la proportion de X marqué permet donc de mesurer la proportion de séquences XpY. Par cette méthode la séquence de tous les dinucléotides possibles peut donc être déterminée. Pour l'ADN de thymus de veau, JOSSE et coll. (47) trouvent pour chaque dinucléotide les fréquences suivantes :

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ApA | , | TpT | .089 | .087 |
| CpA | , | TpG | .080 | .076 |
| GpA | , | TpC | .064 | .067 |
| CpT | , | ApG | .067 | .072 |
| GpT | , | ApC | .056 | .052 |
| GpG | , | CpC | .050 | .054 |

| | |
|---|---|
| TpA | .053 |
| ApT | .073 |
| CpG | .016 |
| GpC | .044 |

## II - ANALYSE DES SEQUENCES POLYPYRIMIDIQUES

Cette étude a été effectuée par trois groupes d'auteurs indépendamment JONES (40-43) BURTON (12) (13) CHARGAFF (16) (87) (94).

Les principes des techniques utilisées sont comparables. Dans tous les cas la labilité de la liaison purine sucre est mise à profit. La première opération consiste à préparer un acide apurinique (acide mercaptocétique JONES, diphénylamine BURTON, hydrolyse acide CHARGAFF). Cette molécule est très fragile , les liaisons phosphodiesters reliant un nucléotide pyrimidique à un sucre libéré de

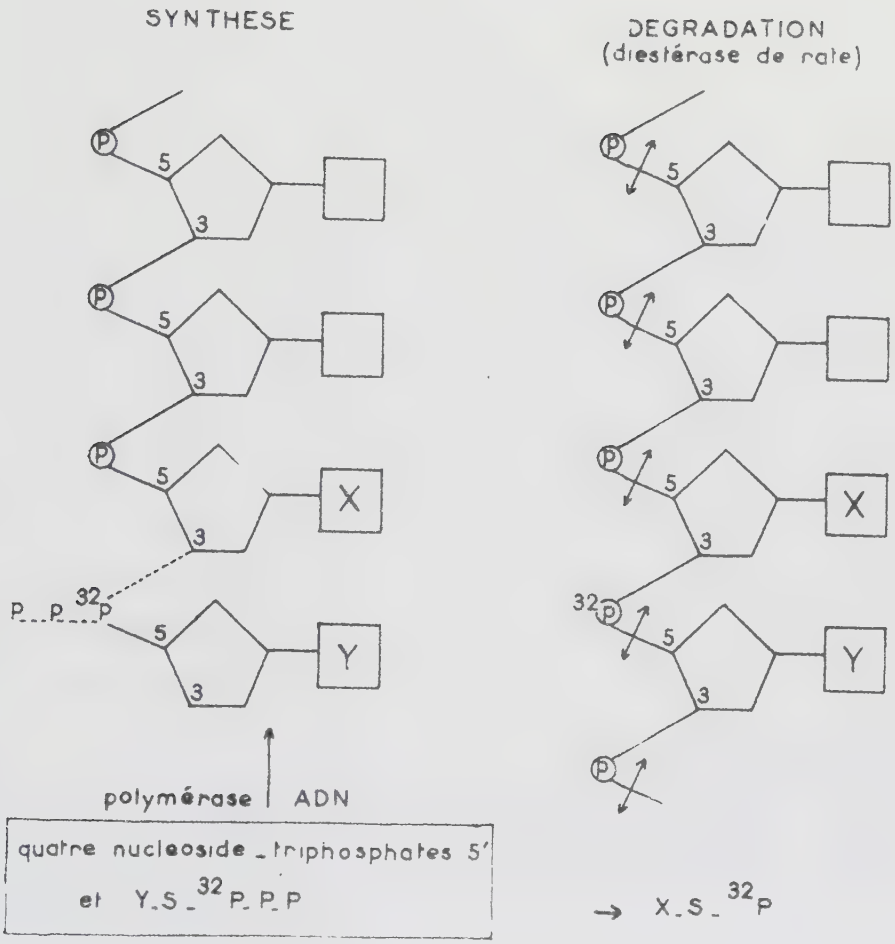
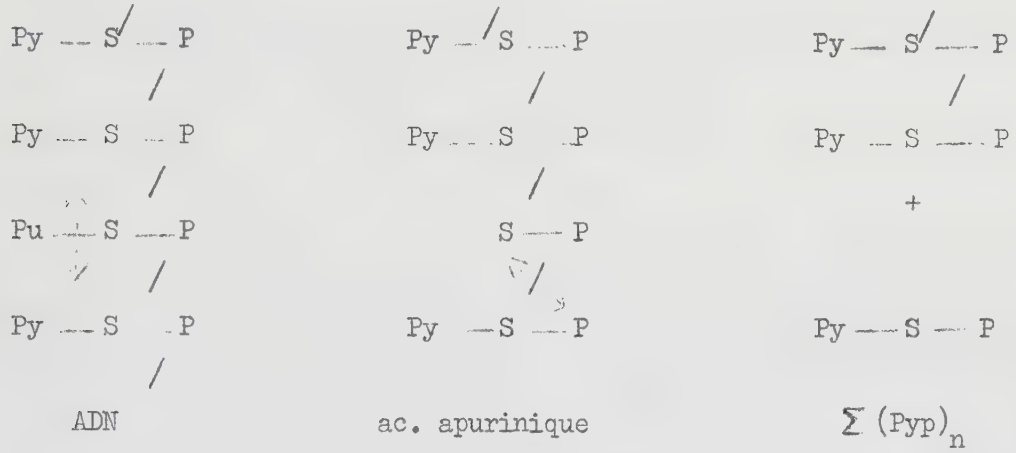



Figure 10 (III)

Représentation schématique de la détermination de la séquence des bases par la méthode du voisin le plus proche.

sa base purique s'hydrolysent très facilement. Il est donc très facile d'isoler les enchaînements $(Pyp)_n$. Cette opération peut être résumée schématiquement de la façon suivante :




Les oligonucléotides polypyrimidiques peuvent alors être séparés quantitativement par chromatographie puis analysés. Nous rapportons les résultats obtenus par les différents auteurs dans le tableau 1 III.

Il est possible de comparer les résultats obtenus avec ceux (calculables) qui seraient observés si la répartition des nucléotides le long de la chaîne moléculaire suivait les lois du hasard.

Comme il y a dans la molécule d'ADN autant de purines que de pyrimidines la probabilité pour qu'une purine Pu ou une pyrimidine Py occupe une place déterminée est 1/2. La probabilité de trouver une séquence déterminée formée de n nucléotides à bases de Pu et /ou Py est :

$$1/2^{n+2}$$

TABLEAU 1 III

COMPARAISON ENTRE LES DISTRIBUTIONS STATISTIQUES ET OBSERVEES

DES ENCHAINEMENTS $Pu(Py)_n Pu$

| n | % pyrimidine totale observé | | | % pyrimidine totale si distribution au hasard |
|---|---|---|---|---|
| | CHARGAFF (94) | BURTON (12) | JONES (41) | |
| 1 | 17,7 | 20,8 | 18,5 | 25 |
| 2 | 17,6 | 11,2 | 23 | 25 |
| 3 | 15,5 | 15,2 | | 18,8 |
| 4 | 13,6 | | | 12,5 |
| 5 | 9,9 | | | 7,8 |
| 6 | 7,3 | | | 4,7 |
| 7 | 5,8 | | | 2,7 |
| 8 | 3,7 | | | 1,6 |
| $\geq 2$ | 64,7 | 68 | 59 | 50 |
| $\geq 3$ | 49,2 | 52,8 | | 31,2 |
| $\geq 9$ | 8,6 | | | 1,9 |

Puisque lorsque l'on fixe une séquence donnée, on fixe également la nature des nucléotides fixés aux deux extrémités. Par exemple, pour avoir une purine isolée $n = 1$ on doit avoir la séquence Py Pu Py. S'il y a N nucléotides dans la chaîne, le nombre de ces séquences sera :

$$N/2^{\,n+2}$$

Le nombre de nucléotides pris dans une séquence n sera :

$$n\,N/2^{\,n+2}$$

On a ainsi :

| | | |
|---|---|---|
| Pu Py Pu | $n = 1$ | Pyrimidines isolées<br>25 % des pyrimidines totales |
| Pu Py Py Pu | $n = 2$ | Pyrimidines par paire<br>25 % des pyrimidines totales |
| $\sum_x$ Pu $(Py)_x$ Pu | $n > 2$ | Pyrimidines par groupe plus grand que 2<br>50 % des pyrimidines totales. |

On peut voir que dans le cas de l'ADN de thymus de veau (c'est également le cas pour les ADN d'autres espèces biologiques) (tableau 1 III) les valeurs observées sont différentes de celles que provoquerait une distribution statistique. C'est là la première preuve apportée montrant que la séquence des bases peut constituer le code génétique. On remarquera également que les bases ont tendance à se grouper entre elles dans ces séquences puisque les valeurs observées pour $n > 3$ sont plus élevées que celles prévues par une distribution statistique. BURTON dit qu'elles ont tendance à former des touffes ("Bunches").

## VIII - COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS PAR LES DEUX METHODES

Pour comparer les résultats obtenus avec les deux types de méthode, on peut par exemple calculer dans l'un et l'autre cas la fréquence des liaisons Pu p Py et Py p Py. Dans la première méthode le calcul est évident puisque l'on connaît la proportion de tous les dinucléotides possibles.

Dans le second cas le calcul peut être fait de la façon suivante :

Pour chaque Py isolé on a Pu Py Pu donc une liaison Pu Py

Pour $n = 2$ Pu Py Py Pu

Il y a deux fois moins de liaisons Pu Py que de pyrimidines prises dans cette séquence (cette dernière valeur étant connue).

D'une façon générale il y a $n$ fois moins de liaisons Pu Py que de pyrimidines prises dans une séquence de taille $n$.

$$Pu\ (Py)_n\ Pu.$$

En particulier, pour les résultats de CHARGAFF, les valeurs sont connues jusqu'à $n = 8$. On calcule pour chaque valeur de $n$ le nombre de liaisons Pu Py et le pourcentage partiel. Soit $x$ la somme jusqu'à $n = 8$ des pourcentages partiels. Le pourcentage réel des liaisons Pu Py dans la molécule est supérieur à cette valeur. Si on calcule le pourcentage de liaisons Pu Py en supposant que les pyrimidines engagées dans des séquences où $n$ est plus grand que 9 sont en fait engagées dans des séquences où $n = 9$, on trouvera une valeur $y$ qui sera supérieure à la valeur réelle $a$. On a donc :

$$x < a < y$$

On peut calculer la proportion de liaisons Py Py d'une façon presque semblable.

Nous avons rassemblé les résultats de ces calculs sur le tableau 2 III.

On peut voir que les résultats peuvent être considérés aux limites d'erreur des deux méthodes comme sensiblement identiques. Les résultats de CHARGAFF correspondent à un nombre de liaisons Pu Py légèrement inférieur, sans que l'on puisse dire si cette différence est significative.

En résumé, on peut voir que le problème de la détermination de la séquence des bases qui est l'un des problèmes les plus passionnants de la Biochimie des acides nucléiques, ne fait que commencer à trouver une solution qui est malheureusement encore très incomplète. Etant donné la complexité du problème, la solution finale risque de demander aux biochimistes à la fois beaucoup de temps de travail et de génie.

# T A B L E A U 2 III

## COMPARAISON ENTRE LES DISTRIBUTIONS STATISTIQUES ET OBSERVEES DES LIAISONS Pu Py et Py Py

| % des liaisons | JOSSE | CHARGAFF | BURTON | HASARD |
|---|---|---|---|---|
| Pu Py | 22,5% | 20 < <20,4 | 17,7< <23,2 | 25 % |
| Py Py | 27,8% | 29,4 < <31,2 | | 25 % |

# C H A P I T R E IV

## LA DIFFUSION DE LA LUMIERE

### Application à l'étude des solutions macromoléculaires (70)

Depuis quelques années, la diffusion de la lumière s'est montrée être la technique la plus utilisée et la plus utile pour déterminer la taille, la forme, le poids moléculaire des particules en solutions diluées. De plus on trouve des appareils commerciaux ayant des caractéristiques très satisfaisantes. Autre avantage:cette technique permet d'étudier le comportement des molécules dans des milieux physiologiques ou dans des conditions très proches de celles rencontrées dans les milieux vivants. D'autres techniques, tel le microscope électronique, nécessitant auparavant un traitement desséchant qui dénature le plus souvent les molécules.

Mais cette techniquecomporte par ailleurs de très sérieuses limitations. Les mesures doivent être effectuées à des concentrations très faibles. La dimension des molécules ne peut être déterminée que si leur taille est supérieure à 300 A°. La difficulté la plus importante est d'obtenir des échantillons d'une pureté absolue. Toutes les particules étrangères, toutes les poussières en suspension doivent être éliminées. Les erreurs commises si on ne prend pas un soin absolu à cet effet sont énormes.

Après avoir rappelé les bases théoriques sur lesquelles reposent cette technique et les calculs permettant de déterminer les caractéristiques moléculaires des particules en solution, nous décrirons l'appareillage utilisé,la méthode et les précautions que l'on doit prendre dans la pratique des mesures, puis nous discuterons les problèmes particuliers que pose l'application de cette technique au cas de l'ADN.

## I - BASES THEORIQUES DE LA DIFFUSION DE LA LUMIERE

Un cristal parfait ne devrait théoriquement pas diffuser la lumière visible, la dimension de la maille du cristal étant faible devant la longueur d'onde de la lumière.

En effet considérons un élément de volume traversé par un faisceau lumineux (fig. 1 IV). Une tranche de cet élément de volume diffuse dans une direction déterminée. Il est toujours possible de trouver une autre tranche b de ce volume tel que la lumière diffusée par cette tranche soit en opposition de phase avec la première.

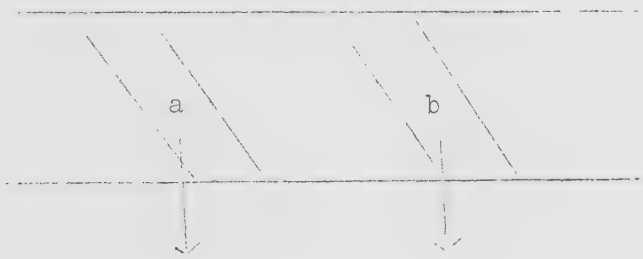



figure 1 (IV)

Il s'en suit qu'en moyenne la lumière diffusée par cet élément de volume est nulle.

Supposons maintenant que ces deux portions de volume soient soumises à des fluctuations désordonnées les unes par rapport aux autres. A un temps t ces portions de volume ne diffuseront plus en opposition de phase, et la lumière diffusée ne sera plus nulle.

Dans les cristaux réels, ce qui provoque la diffusion de la lumière ce sont les vibrations thermiques des atomes, et les irrégularités mécaniques dans les mailles.

Dans les liquides, c'est l'agitation continuelle des molécules qui, se traduisant par des fluctuations de densité, est responsable du phénomène. Toutes les théories de la diffusion de la lumière par les liquides reposent sur la théorie des fluctuations de densité EINSTEIN (27) SMOLUCHOWSKY (92).

Dans le cas des gaz, on peut considérer chaque molécule comme étant indépendante et formant donc un résonateur indépendant. A pression faible, la lumière diffusée sera égale à la somme des lumières diffusées par chaque molécule.

Dans le cas des solutions très diluées, la lumière diffusée sera la somme de la lumière diffusée par le solvant et par chacune des particules en solution. Les mesures, pour être exploitables, devront être effectuées à des concentrations très faibles, et, de plus, être extrapolées à concentration nulle.

Les calculs que nous présentons maintenant (cas des solutions diluées) reposent sur ces données. Ils consistent dans un premier temps à évaluer la lumière diffusée par une particule unique et à faire la somme de la lumière diffusée par toutes les particules considérées comme indépendantes.

Deux cas sont à considérer :

I - cas des particules petites devant la longueur d'onde de la lumière,

II - cas des particules dont les dimensions sont plus grandes que le dixième de la longueur d'onde de la lumière. Dans ce cas tous les points de la particule ne peuvent plus être considérés comme étant en phase.

## A - CAS DES PARTICULES DE DIMENSION INFERIEURE A $\lambda/10$ (loi de RAYLEIGH)

Soit $\lambda_o$ la longueur d'onde de la lumière incidente. La longueur d'onde de la lumière dans une solution dont l'indice de réfraction est $n$ sera

$$\lambda = \lambda_o/n \qquad (1\ IV)$$

Chaque particule peut être considérée comme un dipole unique

$$p = \gamma E \qquad (2\ IV)$$

donne l'excès de polarisation de la particule sur le solvant dans un champs électrique $E$

$$E = E_o \cos\ t \qquad (3\ IV)$$

L'excès de polarisabilité $\gamma$ de la particule dépend de sa forme et de sa taille. Pour des sphères constituées de matière isotrope $(n_1)$

$$\gamma = \frac{3\, n_2^2\, (n_1^2 - n_2^2)}{4\pi\, (n_1^2 + 2n_2^2)}\ V_I \qquad (4\ IV)$$

$n_2$ indice du solvant

Le dipole induit a la même direction que E dans le cas d'une particule isotrope. Dans le cas d'une particule anisotrope, ce n'est plus le cas. La polarisabilité de la sphère est alors exprimée par un tenseur.

$$\gamma\, j = \frac{3n_2^2}{4\pi} \frac{\left[ n_1^j \right]^2 - n_2^2}{\left[ n_1^j \right]^2 + 2n_2^2}\ V_1 \qquad j = 1,\ 2,\ 3 \qquad (5\ IV)$$

Le dipole induit oscille à la même fréquence que E. Supposons le faisceau incident horizontal et venant de la gauche, le vecteur E étant soit vertical (v) soit horizontal (h)

figure 2 (IV)

L'intensité diffusée à $\theta$ est alors :

$$I(\theta) = I_o \left(\frac{16\pi^4}{r^2 \lambda^4}\right) \langle \gamma \rangle^2 \ \Phi(\theta) \qquad (6\ IV)$$

$I_o$ intensité du faisceau incident

r distance de l'observateur à l'échantillon

$\langle \gamma \rangle$ excès de polarisabilité moyenne de la particule

$\Phi(\theta)$ facteur de polarisation dépendant de la polarisation du faisceau incident et de l'anisotropie optique de la particule.

Quand les solutions sont très diluées, la lumière diffusée est simplement la somme des intensités élémentaires.

Si $N_I$ particules par ml, V le volume diffusant

$$I_v(\theta) = V\ N_I\ I(\theta) = I_o\ V\ c\ (16\pi^4\ N/r^2\ \lambda^4 M) \langle \gamma \rangle^2 \Phi(\theta) \qquad (7\ IV)$$

N nombre d'Avogadro M poids moléculaire $c = N_I M/N$ concentration en gramme par millilitre.

Rapport de RAILEIGH $R(\theta) = r^2\ I_v(\theta)/I_o\ V$ (8 IV)

L'excès de polarisabilité moyenne $\langle \gamma \rangle$ peut être rapporté à l'incrément d'indice de réfraction (dn/dc) de la solution.

$$\frac{n - n_2^2}{n + 2n} = 4\pi/3 . \; N_I \langle \gamma \rangle \qquad (9\ IV)$$

à faible concentration :

$$\langle \gamma \rangle = \frac{M}{2\pi N n} \; (dn/dc) \qquad (10\ IV)$$

$$R(\theta) = \frac{c\, 4\pi^2 M n^2}{N \lambda_o^4} \; (dn/dc)^2 \; \Phi(\theta) \qquad (11\ IV)$$

$$R(\theta) = c\, K\, M\, \Phi(\theta) \qquad (12\ IV)$$

$$K = (4\pi^2 n^2 / N \lambda_o^4)\; (dn/dc)^2 \qquad (13\ IV)$$

- Cas des particules isotropes : sphère de matériel isotrope

La lumière diffusée a les mêmes caractéristiques que la lumière incidente. L'intensité de la lumière diffusée varie comme le carré de la projection du vecteur incident sur la direction d'observation (figure 3 IV)

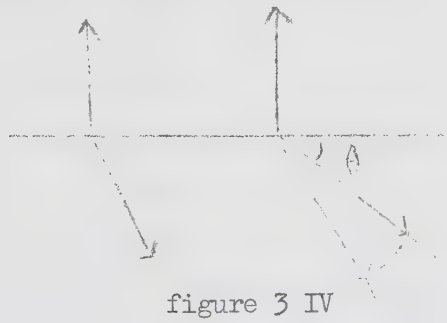



figure 3 IV

$$\Phi_v = I \qquad \Phi_h = \cos^2\theta \qquad \Phi_n = \frac{I + \cos^2\theta}{2}$$

- cas des particules anisotropes.

La lumière diffusée n'a pas les mêmes caractéristiques que la lumière incidente.

Les rapports de dépolarisation sont définis comme :

$$\Delta_v = H_v / V_v \qquad \Delta_h = H_h / V_h \qquad \Delta_n = H_n / V_n \qquad (15\ IV)$$

La lettre en indice représente les caractéristiques de la lumière incidente (h = horizontale, v = verticale, n = naturelle), la grande lettre celle de la lumière diffusée. Par exemple, $H_v$ signifie composante horizontale de la lumière diffusée, faisceau incident polarisé verticalement).

Anisotropie optique $\rho^2$

Elle est définie comme :

$$\rho^2 = \frac{10 \Delta n}{6 + 7 \Delta n} \qquad (16 \text{ IV})$$

$$\Phi n (0) = 1 + \frac{2}{5} \rho^2 = \frac{6 - 3 \Delta n}{6 - 7 \Delta n} \qquad (17 \text{ IV})$$

Dans un milieu trouble, l'intensité du faisceau incident décroît exponentiellement, par suite de la lumière diffusée.

$$I_o (x) = I_o (0) e^{-\tau x} \qquad (18 \text{ IV})$$

$\tau$ = turbidité ou montant total de la lumière diffusée par un millilitre de la solution.

$$\tau = I / I_o \int I_m (\theta) r^2 d\Omega = c (4\pi^2 n^2 M/N \gamma_o^4) (dn/dc)^2 \int \Phi(\theta) d\Omega \qquad (19 \text{ IV})$$

$$\tau = c H M Q \qquad (20 \text{ IV})$$

$$H = (8\pi/3) K \qquad (21 \text{ IV})$$

$Q = 1$ pour des particules isotropes

$Q = 1 + \rho^2$ (22 IV) pour des particules anisotropes

Par extrapolation à $\theta = 0$

$$M = R (0) / cK \qquad (23 \text{ IV})$$

Pour des petites particules, les mesures à 90° étant préférables

$$M = (2 R (90) / CK) (6 - 7 \Delta n) / (6 + 6 \Delta n) \qquad (24 \text{ IV})$$

Les corrections d'anisotropie ne doivent être évidemment prises en considération que si elles sont supérieures aux erreurs expérimentales sur K et $R (\theta)$

Un soin spécial doit être apporté à la mesure de dn/dc qui intervient au carré dans la détermination du poids moléculaire.

Nous reviendrons ultérieurement sur les modalités de cette mesure.

B)- GRANDES PARTICULES AVEC $n_I/n_2$ VOISIN DE UN

Pour de telles particules, le champs électrique à l'intérieure de la particule peut être considéré comme identique à celui à l'intérieur du solvant. Ceci est réalisé pour des suspensions de particules poreuses, protéines solvatées, pelotes très étendues et très solvatées.

L'intensité réduite devient alors :

$$R(\theta) = c\,K\,M\,\Phi(\theta)\;P(\theta) \qquad 25\ IV)$$

$$P(\theta) = \frac{\text{Intensité diffusée par la grande particule}}{\text{Intensité qui serait diffusée s'il n'y avait pas interférence}}$$

$P(\theta)$ est une fonction qui mesure la réduction de la lumière diffusée par suite des interférences entre les dipoles élémentaires. Elle varie de 0 à 1. Pour $\theta = 0$, $P(\theta) = 1$

Cette fonction est caractéristiques de la forme géométrique de la particule. Le calcul en a été fait pour un certain nombre de modèles. En particulier :

sphères : avec $x = \frac{4\pi n\,2}{\lambda_o} \sin\theta/2$

r rayon de la sphère

$$P^{-I}(\theta) = I + X^2/5 + 4x^4/175 \;\ldots\ldots\ldots \qquad (26\ IV)$$

bâtonnets : $y = 2\pi\, nl/\lambda_o)\sin(\theta/2)$

$$P^{-I}(\theta) = I + y^2/9 + 7y^4/2025 \;\ldots\ldots\ldots \qquad (27\ IV)$$

l longueur du bâtonnet d diamètre du bâtonnet

Pelote statistique $z = (8\pi^2 n^2 R^2/3\lambda_o^2)\sin^2\theta/2$

$$P^{-I}(\theta) = I + z/3 + z^2/36 \;\ldots\ldots \qquad (28\ IV)$$

R, distance moyenne entre les deux extrémités de la pelote $P^{-I}(\theta)$, devient indépendant de la forme géométrique de la particule lorsque $\theta \to 0$, et devient une mesure du rayon de giration $R_G$ qui peut être défini comme la

valeur moyenne des carrés des distances entre le centre de gravité et les différents points de la particule.

On démontre que :

$$\lim P(\theta) = I - \frac{16\pi^2 n^2}{3\lambda_o^2} R_G^2 \sin^2 \theta/2 \qquad (29\ IV)$$

$$\lim P^{-I}(\theta) = I + \frac{16\pi^2 n^2}{3\lambda_o^2} R_G^2 \sin^2 \theta/2 \qquad (30\ IV)$$

$R_G$ epeut donc être facilement déterminé à partir de la pente de $P^{-I}(\theta)$ pour les faibles valeurs de $\theta$, tandis que la forme de la particule, si elle est d'un modèle déjà décrit peut facilement être déterminé d'après l'allure de le courbe. La figure 4 IV représente les différentes courbes $P^{-I}(\theta)$ pour les divers modèles. Ces courbes correspondent à des particules ayant même $R_G$.

Si l'on connaît le P.M. et le volume spécifique de la particule, on peut calculer à l'aide du rayon de giration si le modèle choisi est compatible. Nous donnons ici, à titre indicatif, les différentes valeurs du rayon de giration calculé pour un composé de PM 500 000 et pour différents modèles.

| | | |
|---|---|---|
| sphère | | 45A° |
| pelote | | 205A° |
| batonnet | d=25A° | 410A° |
| | d=15A° | 1150A° |
| | d=10A° | 2550A° |

Le rayon de giration pouvant être relié aux dimensions des particules quand leur forme est connue

sphère $R_G^2 = (3D^2/20)$ (D diamètre) (31 IV)

bâtonnet $R_G^2 = L^2/12$ (L longueur) (32 IV)

pelote $R_G^2 = R^2/6$ (R, distance moyenne entre les deux extrémités de la pelote.) (33 IV)

- Dissymétrie.

Souvent utilisée dans les mesures de diffusion de la lumière, est définie comme :

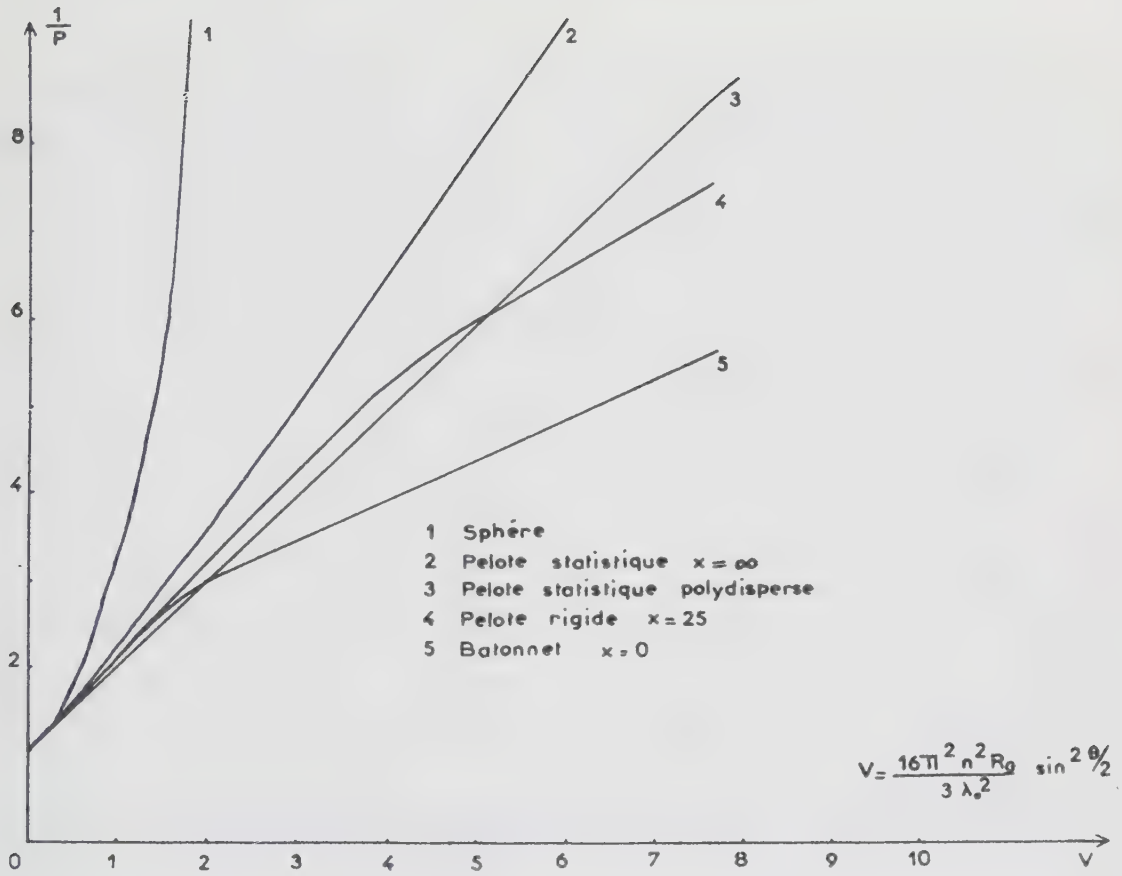



Figure 4 IV

Fonctions $P^{-1}(\theta)$ pour différents modèles et pour des particules ayant même rayon de giration.

$$z_\theta = R(\theta)/R(\pi - \theta) \qquad (34\ IV)$$

le plus souvent utilisé

$$z_{45} = R(45)/R(135) \qquad (35\ IV)$$

La figure 5 IV montre comment cette valeur est reliée, pour un modèle donné aux dimensions de la particule.

- Dépendance de la lumière diffusée avec la concentration

La lumière diffusée est, comme nous l'avons vu, due à des fluctuations de concentration. En reliant ces fluctuations de concentration à des fluctuations de polarisabilité EINSTEIN (27) calcula l'excès de turbidité de la solution comme une fonction du changement de pression osmotique $d\Pi$ avec la concentration

$$= \frac{32\pi^2 n^2}{3N\lambda_0^4} \cdot \frac{c\,(dn/dc)^2}{(c/RT)\,(d\Pi/dc)} \qquad (36\ IV)$$

$$\Pi/RT = c/M + Bc^2 \qquad (37\ IV)$$

$$cH/\tau = I/M + 2Bc + \ldots \qquad (38\ IV)$$

La pente de la courbe $cH/\tau = f(c)$ est deux fois le coefficient du second viriel.

$$cK\,\Phi(\theta)/R(\theta) = I/M\,P(\theta) + 2Bc \qquad (39\ IV)$$

$$\Phi(\theta)/R(\theta) = I/D_s(\theta) \qquad (40\ IV)$$

$D_s(\theta)$ coefficient de diffusivité.

## II - APPAREILLAGE

L'appareil (figure 6 IV) que nous avons utilisé et que nous décrirons ici est un appareil "SOFICA", type commercial de l'appareil décrit par WIPPLER et SCHEIBLING (107). La lumière émise par une lampe à vapeur de mercure (L. Hg) traverse un filtre anticalorique A puis un filtre optique qui permet de sélectionner l'une des raies de la lampe soit 5460 A° soit 4350 A°. Grâce à un jeu de lentilles, le faisceau incident monochromatique de divergence inférieure à 3° pénètre

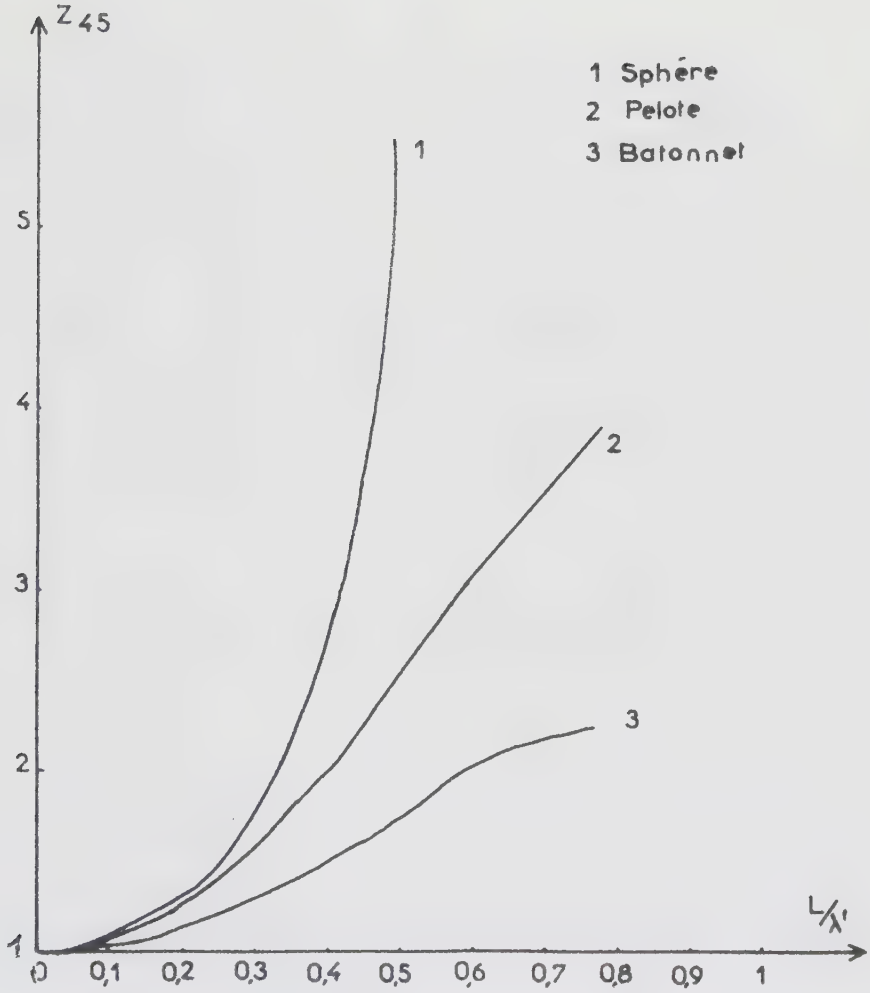



Figure 5 IV

Variations du rapport de dissymétrie $z_{45} = I_{45}/I_{135}$ en fonction de la taille de différentes particules.

1 = Sphère ; 2 = Pelote ; 3 = Bâtonnet

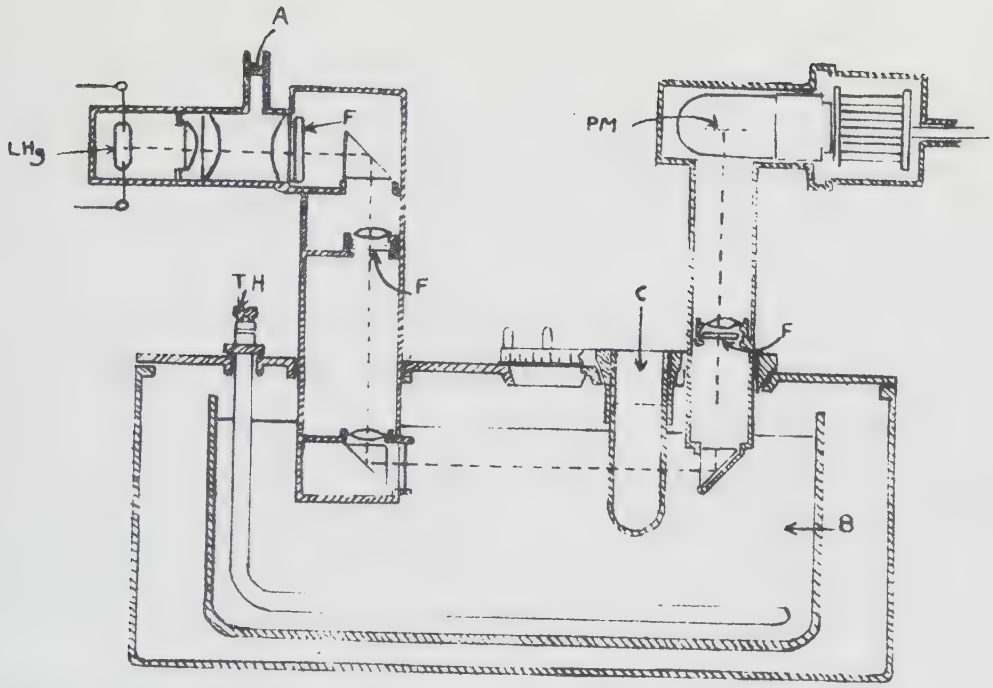



Figure 6 IV

Schéma de l'appareil de WIPPLER et SCHEIBLING pour les mesures de diffusion de la lumière.

dans une cuve de benzène, susceptible d'être thermostatée (Th) ou baigne la cellule de mesure (C). Le benzène ayant un indice de réfraction voisin de celui du verre, l'importance des réflections parasites est ainsi diminuée.Le faisceau incident, après avoir traversé la cellule est annulé par un verre absorbant. L'intensité de la lumière diffusée est mesurée grâce à un photomultiplicateur (PM). L'intensité du courant débité par ce PM proportionnel à l'intensité de la lumière frappant sa photocathode, est mesurée à l'aide d'un galvanomètre très sensible. Le PM peut tourner autour de l'axe de la cellule. Les différents angles $\theta$ sont compris entre 30° et 150°. Le volume diffusant intercepté par le PM varie dans ces conditions comme $\sin\theta$ . L'intensité du faisceau incident peut être dosée par l'intermédiaire d'une fente de largeur variable. De plus un filtre peut être placé sur le parcours du faisceau diffusé. Ceci permet de contrôler l'absence de lumière parasite provenant d'une fluorescence.

En principe l'appareil est étalonné avec le benzène dont on connait le rapport de RAYLEIGH. Pour simplifier les manipulations, on utilise comme étalon un bâton de verre diffusant, dont les qualités doivent être constantes au cours du temps, et qui est lui-même étalonné par rapport au benzène. Pour éviter une erreur systématique, l'étalonnage du verre diffusant doit être fait très soigneusement. Le benzène utilisé doit être très pur et redistillé plusieurs fois pour éliminer les impuretés fluorescentes. Il doit être de plus totalement dépoussiéré.

## III - DEPOUSSIERAGE DES SOLUTIONS

Pour être valables, les mesures de diffusion de la lumière doivent être effectuées sur des solutions d'une pureté optique absolue. Tout liquide, avant toute mesure, doit être débarrassé de toute poussière ou toute particule étrangère en suspension. Pour parvenir à ce résultat, deux sortes de procédé peuvent être utilisés, filtration ou centrifugation.

Les filtrations sont effectuées soit sur des verres frittés N°5 (les filtres que nous avons utilisés avaient été spécialement confectionnés pour nous à cet effet par la société Sovirel), soit sur des membranes ultra-filtrantes. Parmi toutes les sortes de membranes que nous avons pu utiliser, celles qui nous ont donné les meilleurs résultats sont les membranes "Millipores". Les pores de ces membranes sont calibrés, et pour une membrane de type donné le diamètre des pores peut être considéré comme constant. Nous avons utilisé selon le cas des membranes dont le diamètre des pores était respectivement de 0,30 $\mu$ 0,45 $\mu$ 0,65 $\mu$ et 1,25 $\mu$ .

Par filtration sur ces membranes il est facile d'obtenir de l'eau dont la dissymétrie est négligeable. La filtration sous pression est préférable à la filtration sous vide. En effet lorsqu'on utilise cette dernière technique, il se forme souvent des micro-bulles à l'intérieur des solutions qui s'éliminent très lentement. Dans tous les cas où la filtration est utilisable (eau, benzène, solvant organique, solution de petites particules, solution de protéines, etc...) comme elle est plus simple et plus rapide, elle doit être préférée à tout autre technique. Par contre, dans le cas des grosses particules, par exemple l'ADN, la filtration n'est possible que dans des conditions très particulières. Pour l'ADN, nous n'avons obtenu de résultats satisfaisants que lorsque la concentration des solutions était inférieure à 30 μ g/ml, et que le diamètre des pores était d'au moins 1,25 μ . Par contre pour des solutions de concentration supérieure, l'ADN se dénature et les membranes se colmatent presque instantanément. La figure 7 IV représente le diagramme de diffusion d'une solution d'ADN filtrée dans différentes conditions. Dans les conditions où nous avons opéré, le spectre d'absorption de la lumière U.V. n'était pas modifié.

La centrifugation est certainement le procédé de choix à utiliser pour la purification de solution de grosses particules, donc d'ADN. Toutefois les conditions expérimentales doivent être bien précisées. La centrifugation doit être effectuée à une vitesse suffisamment rapide pour éliminer toutes les poussières, mais la vitesse ne doit pas dépasser une certaine limite au delà de laquelle les particules les plus lourdes seraient susceptibles de sédimenter. Le fractionnement qui s'opérerait devrait alors être pris en considération.

Au cours des différentes expériences que nous avons effectuées, la méthode qui nous a donné les meilleurs ésultats a été la suivante :

Tous les solvants sont d'abord filtrés sur membranes millipores 0,30 μ . Les solutions sont préparées avec ces solvants propres puis centrifugées 5 heures à 30 000 g dans une centrifugeuse Servall. Alors que la filtration est effectuée directement dans la cellule de mesure, dans le cas de la centrifugation, il est nécessaire de faire passer les solutions des cellules de centrifugation dans les cellules de mesure sans les contaminer. De nombreux auteurs ont utilisé à cet effet des pipettes rincées avec un solvant propre. Nous n'avons jamais pu obtenir de résultats satisfaisants par ce procédé. Nous avons utilisé une technique à la fois plus simple et plus rapide et qui nous a donné de très bons résultats.

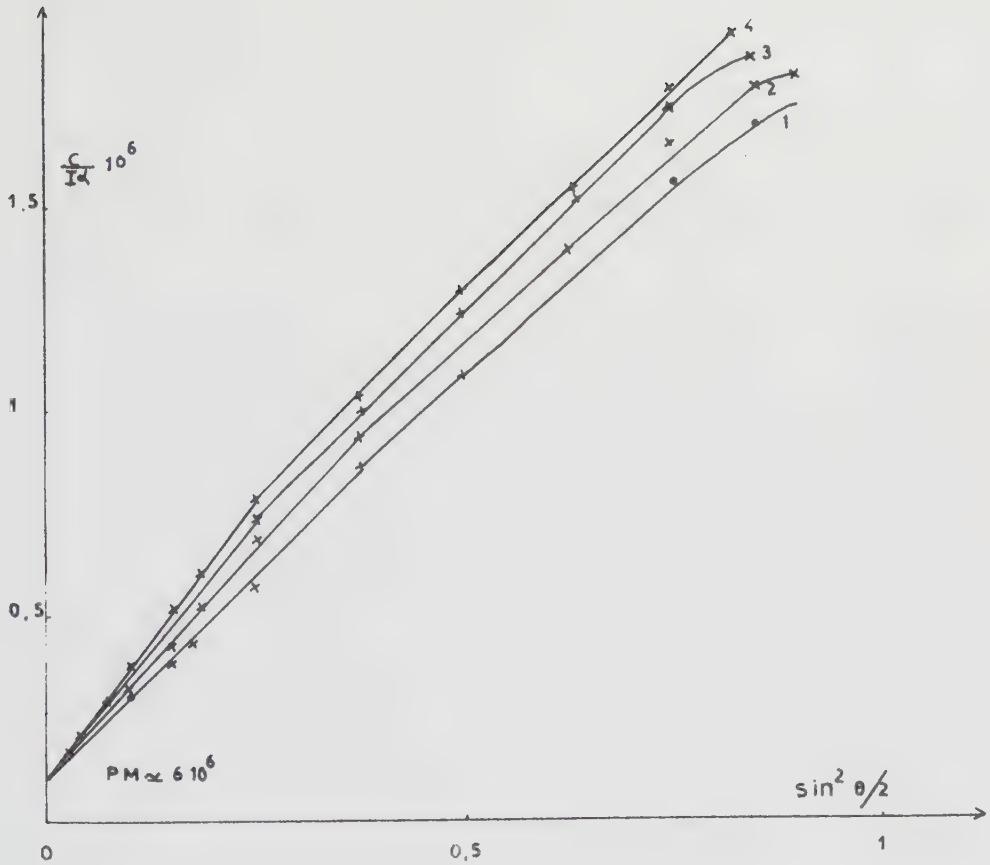



Figure 7 IV

Diagrammes de diffusion d'un ADN filtré dans diverses conditions

1 - ADN filtré sur verre frité n° 5
2 - ADN filtré sur millipores 0,45 μ
3 - ADN filtré sur millipores 0,65 μ
4 - ADN filtré sur millipores 1,2 μ

La centrifugation s'opérant dans des pots en acier inoxydable d'une contenance de 50 ml, les 10 premiers ml sont rejetés, puis les 30 ml nécessaires pour effectuer la mesure sont versés directement dans la cellule de mesure. Après plusieurs transvasements opérés de cette manière, nous avons pu constater que les mesures de diffusion de la lumière étaient reproductibles et donc qu'on n'y avait pas, pendant cette opération, de contamination.

## IV - PRATIQUE DES MESURES

La façon dont on effectue les mesures repose sur les considérations théoriques déjà effectuées.

Dans le cas général :

$$cK\,\Phi(\theta)/R(\theta) = (I/M)/P(\theta) + 2Bc \qquad (39\ IV)$$

$$K = (4\pi^2 n^2/N\lambda_o^4)\,(dn/dc)^2 \qquad (13\ IV)$$

$$R(\theta) = (r^2 I_v(\theta)/I_o V) \qquad (41\ IV)$$

en lumière naturelle

$$\Phi_n(\theta) = (I + \cos^2\theta)/2 \qquad (14\ IV)$$

K est connu dès que dn/dc est connu.

Pour mesurer $R(\theta)$ on opère de la façon suivante.

La grandeur effectivement mesurée est un courant dont l'intensité est proportionnelle à l'intensité lumineuse. Il est donc nécessaire dans un premier temps d'étalonner l'appareil avec un liquide dont on connait le rapport de RAYLEIGH, le benzène par exemple :

$Rb = 16\ 10^{-6}$ pour $_o = 5\ 460$ A°

$Rb = 48{,}5\ 10^{-6}$ pour $_o = 4\ 360$ A°

$$I_o V/r^2 = I_B/R_B \qquad (42\ IV)$$

$I_B$ est l'intensité diffusée par le benzène dans les conditions expérimentales. Il peut être exprimé en unité arbitraire. Pour un liquide quelconque on a :

$$R(\theta) = (I(\theta)\,R_B)/I_B \qquad (43\ IV)$$

$I(\theta)$ est exprimé dans les mêmes unités que $I_B$.

($I(\theta)$ est alors corrigé du facteur $\Phi_n(\theta)$ et d'un facteur tenant compte des variations de volume intercepté quand $\theta$ varie. Ces deux corrections sont réunies dans un facteur $\alpha$

$$\alpha = \sin\theta / (I + \cos^2\theta) \qquad (44\ IV)$$

Les valeurs de $\alpha$ pour les différents angles auxquels sont effectuées les mesures sont rassemblées sur le tableau I IV. Dans ces conditions, on a :

$$I/M = (2\pi^2 n_b^2 / \lambda_o^4 N R_B)(dn/dc)^2 I_B (c/I)_{\substack{\theta=0 \\ c=0}} \qquad (45\ IV)$$

ou $(c/I)_{\substack{\theta=0 \\ c=0}}$ est la valeur de $c/I(\alpha)$ extrapolée pour $c=0$ et $\theta=0$

pour $\lambda_o = 5\ 460$ A° $\qquad 2\pi^2 n^2 / \lambda_o^4 N R_B = 0{,}505$

Pour un produit donné et $I_B$ fixé

$$I/M \quad \text{constante} \times (c/I\alpha)_{\substack{\theta=0 \\ c=0}} \qquad (46\ IV)$$

En pratique les mesures s'effectuent de la façon suivante :

I) étalonnage. $I_B$ est fixé en faisant varier la largeur de la fente.

II) la mesure de $I_\theta$ est faite sur le solvant

III) la mesure de $I_\theta$ est ensuite faite sur la solution pour différentes concentrations. Les valeurs de $I_\theta$ pour le solvant sont retranchées de celles de la solution. Cette différence est ensuite corrigée du facteur $\alpha$, $I\alpha$ est ainsi calculé. Les valeurs de $c/I\alpha$ sont alors portées graphiquement en fonction de $\sin^2\theta/2 + Kc$ où K est une constante arbitraire choisie pour les commodités de la représentation graphique. On obtient ainsi un diagramme que l'on a représenté dans le cas de l'ADN sur la figure 8 IV . Ce mode de représentation graphique est dit diagramme de ZIMM. Les valeurs de $c/I\alpha$ peuvent être extrapolées à concentration nulle et angle nul. On obtient les courbes $(c/I\alpha)_{c=0}$ et $(c/I\alpha)_{\theta=0}$

Ces deux courbes se coupent sur l'axe des ordonnées au point P tel que :

$$OP = (c/I\alpha)_{\substack{\theta=0 \\ c=0}}$$

Cette valeur permet donc de calculer le poids moléculaire selon l'expression 45 IV au 46 IV.

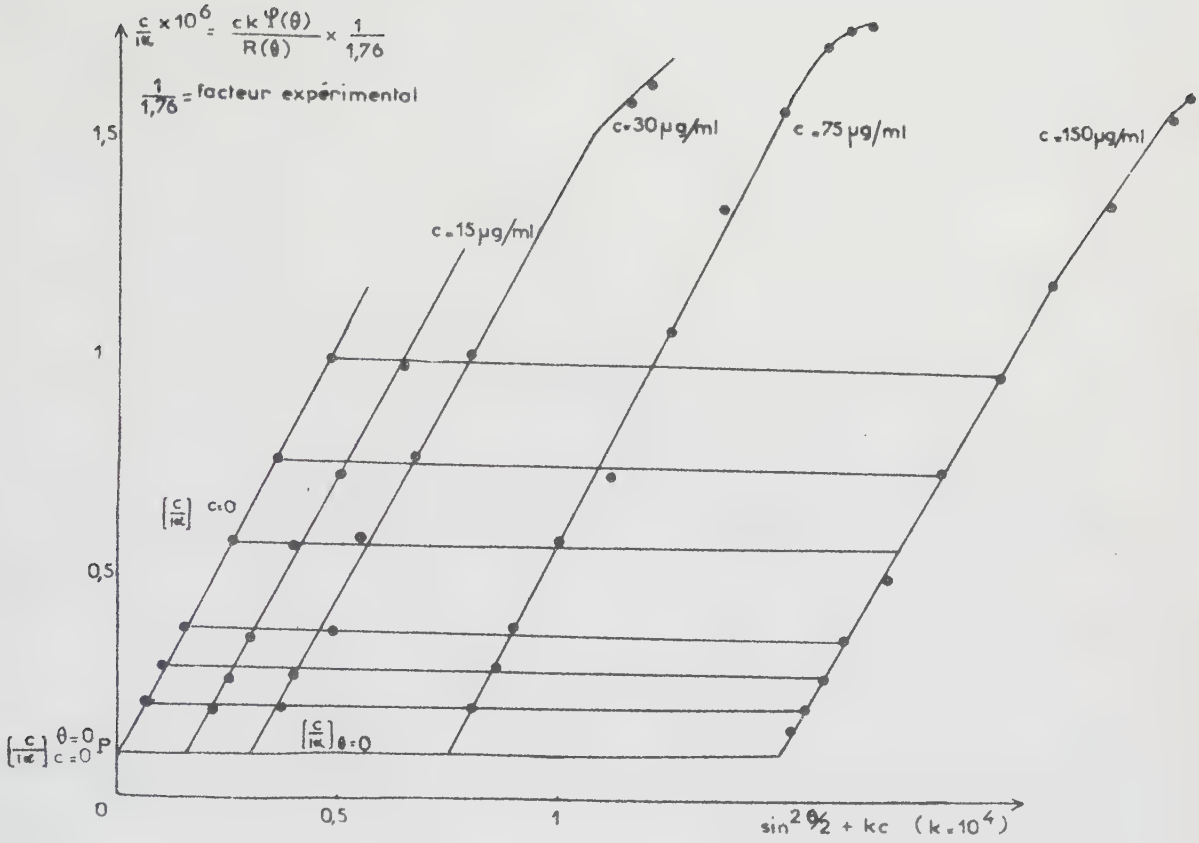



Figure 8 IV

Diagramme de ZIMM dans le cas d'un ADN.

La pente initiale $P_D$ de la courbe $(c/I\,\alpha)_{c=0}$ permet de calculer le rayon de giration $R_G$. Si on prend comme unité sur l'axe des ordonnées le segment OP, la pente de la courbe $(c/I\,\alpha)_{c=0}$ multiplié par $3\,\lambda_o^2/(16\,\pi^2\,n^2)$ mesurera le carré moyen du rayon de giration. Ceci découle directement de l'équation :

$$\lim_{\sin\theta/2 \to 0} P^{-I}(\theta) = I + (16\,\pi^2 n^2\ R_G^2)/(3\,\lambda_o^2)\ \sin^2\theta/2 \qquad (30\ IV)$$

$$R_G^2 = \frac{3\,P_D\,\lambda_o^2}{16\,\pi^2\,n^2} \qquad (47\ IV)$$

Avec $_o$=5460 A° $\qquad \dfrac{3\ \lambda_o^2}{16\,\pi^2\,n^2} = (565)^2$

Dans ce cas particulier (figure 8 IV) $I_B$=120 dn/dc=0,17 la constante de l'équation 46 IV vaut donc 1,76

$$OP = 0{,}10\ 10^{-6}$$

$$M = 10^7/1{,}76 = 5{,}7\ 10^6 \qquad R_G = 565 \times 4{,}2 = 2370A°$$

La pente de la courbe $(c/I\,\alpha)^{\theta=0}$ permet de calculer le deuxième coefficient du viriel B. Ici, dans le cas de l'ADN celui-ci est nul et il n'y a aucune dépendance de $c/I\,\alpha$ avec la concentration.

## V - APPLICATION DE LA DIFFUSION DE LA LUMIERE AU CAS DE L'ADN

a) artefacts

Par suite de la viscosité élevée des solutions d'ADN, il est parfois difficile d'éliminer les poussières par centrifugation. Il en résulte donc souvent des erreurs par excès.

Le poids moléculaire ainsi déterminé est un P.M. pondéré en poids. La définition de ce P.M. est :

si $n_i$ particules de masse $M_i$

$$M_w = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum n_i M_i}$$

Ceci a pour conséquence, que si les mesures sont faites sur un système polydisperse, ce sont les particules de masse les plus grandes qui importent le plus

sur le résultat final.

Les molécules, comme nous le montrerons dans ce travail sont souvent agrégées entre elles par des traces de protéines. Il en résulte qu'il se forme de très grosses particules capables de fausser complètement les résultats. Certains échantillons d'ADN sont même complètement agrégés. C'est-à-dire que nous avons trouvé :

- qu'à l'ultracentrifugation, toutes les particules sédimentent,
- qu'en diffusion de la lumière, le PM apparent est infini. La courbe $c/I\alpha = f(\sin^2 \theta /2)$ passe par l'origine. Sur de tels échantillons, nous avons alors effectué un traitement par les enzymes protéolytiques (chymotrypsine et trypsine). Dans tous les cas les masses moléculaires ont été ramenées à des valeurs voisines de 6 à 8 millions. La figure 9 IV représente les diagrammes de diffusion de la lumière pour un échantillon d'ADN agrégé avant et après traitement par la chymotrypsine.

Notre technique de traitement des échantillons d'ADN agrégés par la chymotrypsine, inspirée de celle de HERMANS (33) a été la suivante :

100mg d'ADN en fibres sont dissous dans 50 ml de tampon phosphate 0,02 M pH 7,5 avec 20 mg de chymotrypsine. Un cristal de thymol est ajouté pour empêcher toute fermentation bactérienne. De plus il est bon de vérifier auparavant que la préparation de chymotrypsine est exempte de desoxyribonucléase. Dans ces conditions, lorsque l'ADN est agrégé, il se forme de gros gels. Ce mélange, porté à 37°C est agité doucement jusqu'à dissolution totale des gels. Cette opération nécessite en général de 12 à 24 heures. Après ce temps, 3 g de ClNa sont ajoutés. La chymotrypsine est alors éliminée par la méthode de déprotéinisation de SEVAG (84). La solution est agitée avec un égal volume d'un mélange (chloroforme 9v, alcool amylique Iv). Le mélange centrifugé se sépare en trois couches. La couche inférieure chloroformique, la couche intermédiaire où sont rassemblées les protéines dénaturées et insolubilisées, la couche supérieure aqueuse contenant l'ADN moins les protéines. Ce traitement est répété jusqu'à ce qu'aucun film protéique ne se rassemble plus à l'interface chloroforme-eau. L'ADN peut être alors précipité par l'alcool et redissous dans le solvant choisi.

Lorsque l'agrégation n'intéresse qu'une partie des molécules, on peut ultracentrifuger les préparations et éliminer ainsi les constituants les plus lourds. Nous avons également utilisé cette technique pour déterminer la proportion de molécules agrégées. Les solutions sont ultracentrifugées avec une ultracentrifu-

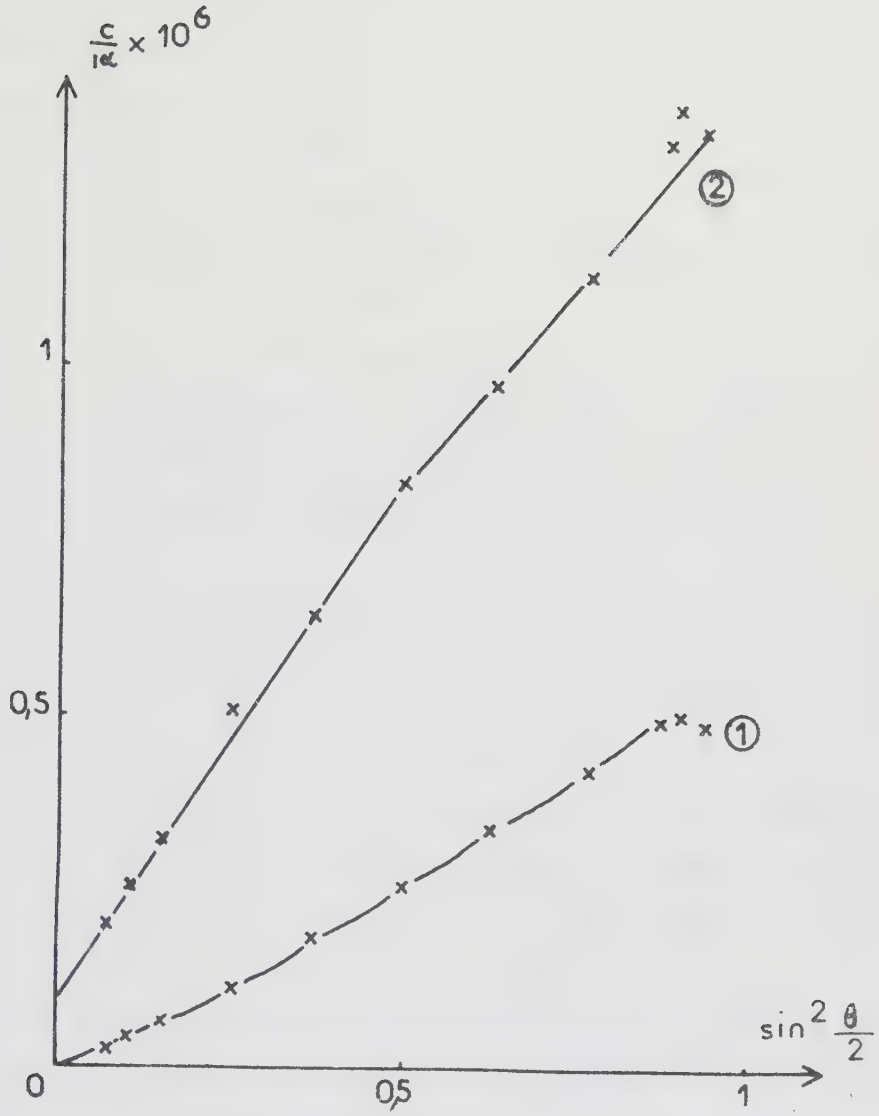



Figure 9 IV

Diagramme de diffusion de l'ADN $V_5$ avant (1) et après (2) traitement pas la chymotrypsine

1 - P.M. = 00
2 - P.M. = 7 $10^6$

geuse préparative (Spinco) à 80 000 g pendant une heure. L'analyse des surnagenat avant et après centrifugation permet de calculer la quantité d'ADN agrégé.

Les préparations ainsi traitées aux enzymes protéolytiques ont des propriétés différentes. Les poids moléculaires et les rayons de giration sont changés, et les fibres d'ADN ainsi traitées se dissolvent dans les solutions salines avec une rapidité extraordinaire, ces fibres explosant alors littéralement dans le solvant. Les modifications physico-chimiques des préparations ainsi traitées sont donc très importantes et loin d'être totalement connues.

Nous avons observé, comme SADRON et POUYET (82), que l'agrégation était d'autant plus importante que les préparations contenaient plus de protéines et qu'elles avaient été conservées plus longtemps à l'état de fibres. L'idéal, du point de vue physico-chimique est de redissoudre immédiatement après leur précipitation par l'alcool les fibres d'ADN.

Le poids moléculaire des échantillons que nous avons traités par la chymotrypsine peut être lu sur le tableau 3 IV

b) Modèle moléculaire de PETERLIN (69) (Pelotes rigides)

Le modèle qui semble le mieux rendre compte des résultats expérimentaux est le modèle dit "worm like chain" ou chaîne vermiforme. Ce modèle a été décrit la première fois par KRATCKY et POROD (53). Il a été ensuite appliqué au cas de la diffusion de la lumière par PETERLIN (69) (70) et HERMANS (34) (36).

Dans le cas de la pelote stastique, bien connue, on montre que la probabilité de trouver une distance $r$ entre deux éléments de la chaîne :

$$w(r)\,dr = 4\pi(\mu/\pi^3)^2\, r^2\, e^{-\mu r^2}\, dr \qquad (48\ IV)$$

$$\mu = 3/2.\langle r^2\rangle^{-I} \qquad (49\ IV)$$

$\langle r^2\rangle$ moyenne de $r^2$

Si deux éléments considérés de la chaîne sont séparés par $m$ liens et, si le carré moyen de la longueur d'un de ces liens est $A^2$

$$\langle r^2\rangle = m\,A^2 \qquad (50\ IV)$$

En particulier, le carré moyen de la distance d'une extrémité à l'autre est $N\,A$ quand la chaîne contient $N + I$ segments. Le rayon de giration est alors :

$$R_g^2 = (NA^2)/6 \qquad (51\ IV)$$

Ces équations s'appliquent quand l'orientation des segments les uns par rapport aux autres se fait au hasard, d'où le nom de pelote statistique. Dans le modèle de KRATCKY et POROD, l'angle formé par deux segments successifs est petit. Ils considèrent $n$ segments de longueur $\sigma$. La longueur totale de la chaîne est $L=n\sigma$

Si $\alpha$ est l'angle entre deux segments successifs.

Si $K = \langle \cos \alpha \rangle$

$$a = -\sigma / \ln K \qquad (52\ IV)$$

$a$ est appelé "persistence lenght"

$x=L/a$ facteur de flexibilité de la particule

Quand $a$ augmente le modèle tend vers la pelote statistique $x=00$
Quand $x=0$, on a un bâtonnet.

Ce modèle peut donc représenter tous les intermédiaires entre le bâtonnet et la pelote statistique. La mesure de $x$ ou de $a$ permet de mesurer l'écart entre ces deux modèles.

Calcul de $a$ et $x$

HERMANS (34) a calculé les valeurs de $P(\theta)/(2a^2)$ pour différentes valeurs de $\beta=ha$ (avec $h=(4\pi/\lambda)\sin\theta/2$) et différentes valeurs de $x$ comprises entre 20 et 160. Pour calculer $x$, nous avons imaginé le procédé graphique suivant :

Nous avons tracé les différentes courbes $\log 2a^2/P(\theta) = f(\log\beta)$ pour plusieurs valeurs de $x$.

Nous avons calculé les valeurs numériques de $\log 2a^2/P(\theta)$ et de $\log\beta$ à partir des chiffres calculés par HERMANS ;

$$\log\beta = \log h + \log a \qquad (53\ IV)$$

$$P(\theta) = K'K/c \qquad (54\ IV)$$

$$\log 2a^2/P(\theta) = -\log K' + \log c/I\alpha + \log 2a^2 \qquad (55\ IV)$$

On trace la courbe $\log c/I\alpha$ en fonction de $\log \sin\theta/2$. Il est alors facile de faire correspondre cette courbe expérimentale à l'une des courbes précédemment déterminée par une translation horizontale de $\log a + \log 4\pi/\lambda$ et par une translation verticale de $-\log 2a^2 + \log K'$; $x$ se trouve alors déterminé.

La grandeur de la translation effectuée pour amener les deux courbes à se superposer permet de calculer $a$.

En pratique, on trace la courbe expérimentale sur du papier millimétré transparent. Il est alors extrêmement facile de faire correspondre les courbes expérimentales et théoriques.

Le tableau 2 IV donne les valeurs de $\log 2a^2/P(\theta)$ en fonction de $\log \beta$ pour différentes valeurs de $x$.

Les figures 10 IV et 11 IV représentent graphiquement ces données. La figure 12 IV représente une courbe expérimentale dans le cas d'un ADN. La figure 13 IV représente l'allure des fonctions $P^{-I}(\theta)$ pour différentes valeurs de $x$.

Nous avons trouvé, comme PETERLIN (70), pour $x$ des valeurs comprises entre 50 et 100.

Pour déterminer $x$, comme on peut s'en rendre compte sur la figure 12 IV des mesures aux très faibles angles sont nécessaires.

- Détermination de la masse par unité de longueur M/L SADRON (81)

On montre que pour une chaîne en zig zag et pour les grandes valeurs de hl où :

$h = 4\pi / \lambda) \sin \theta/2$ L longueur de la chaîne.

Pour des particules de grandes dimensions et quand la fonction $cK/R(\theta) = f(\sin \theta/2)$ est assymptotique à une droite d'équation :

$$cK/R(\theta) = N/\pi^2 M(2 - \frac{\pi^2 (N-I)}{2N}) + hL/M\pi$$

N étant le nombre d'éléments par chaîne.

L'intersection de cette droite avec l'axe des ordonnées est négative. La pente de cette droite est égale à

$$4 L/M\lambda$$

La mesure ce cette pente fournit donc un moyen de mesurer M/L. SADRON et coll. (81) ont montré que ce modèle pouvait s'appliquer à l'ADN avec une approximation suffisante. Les valeurs trouvées pour M/L sont d'ailleurs en accord avec celles prévues par le schéma de WATSON et CRICK c'est-à-dire 200 par angstrom.

Sur la figure 14 IV, nous avons représenté les variations de $c/I\alpha = f(\sin \theta/2)$. Dans ces conditions la valeur que nous avons trouvée pour M/L n'est pas significativement différente de la valeur théorique de 200/A°.

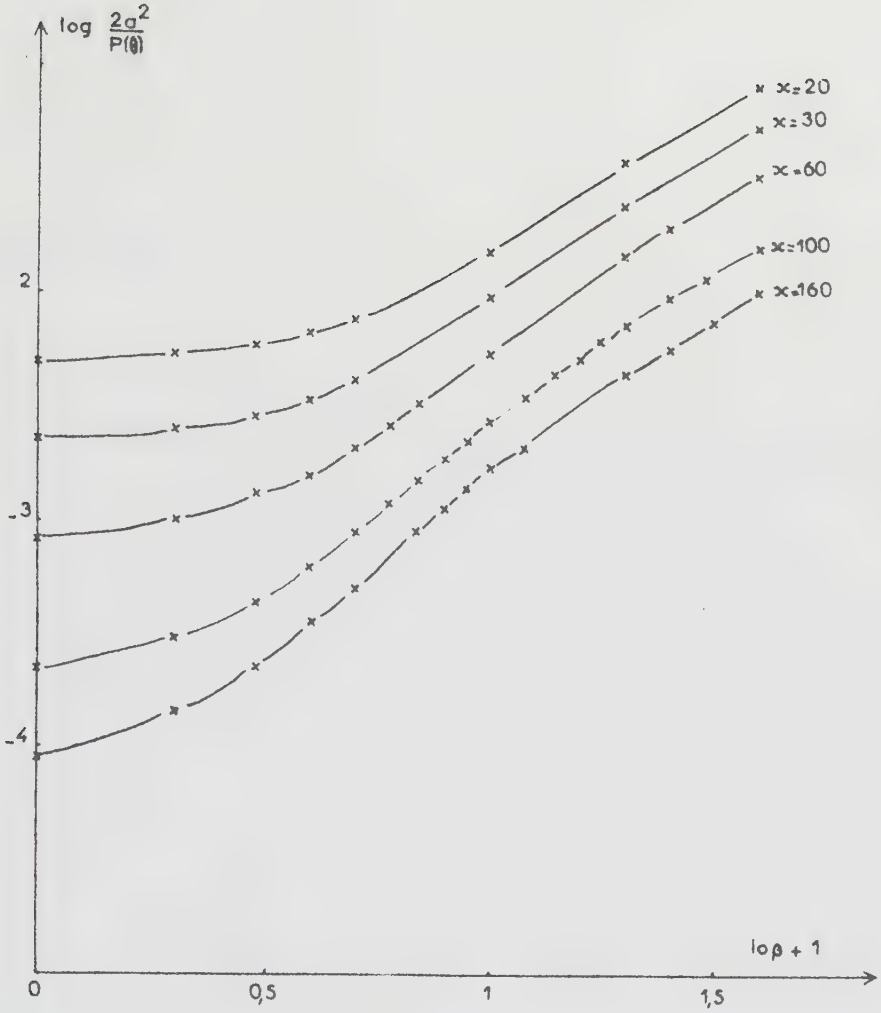



Figure 10 IV

Variations théoriques de log $2\,a^2/P\,(\theta) = f\,(\log \beta)$ pour différentes valeurs de x.

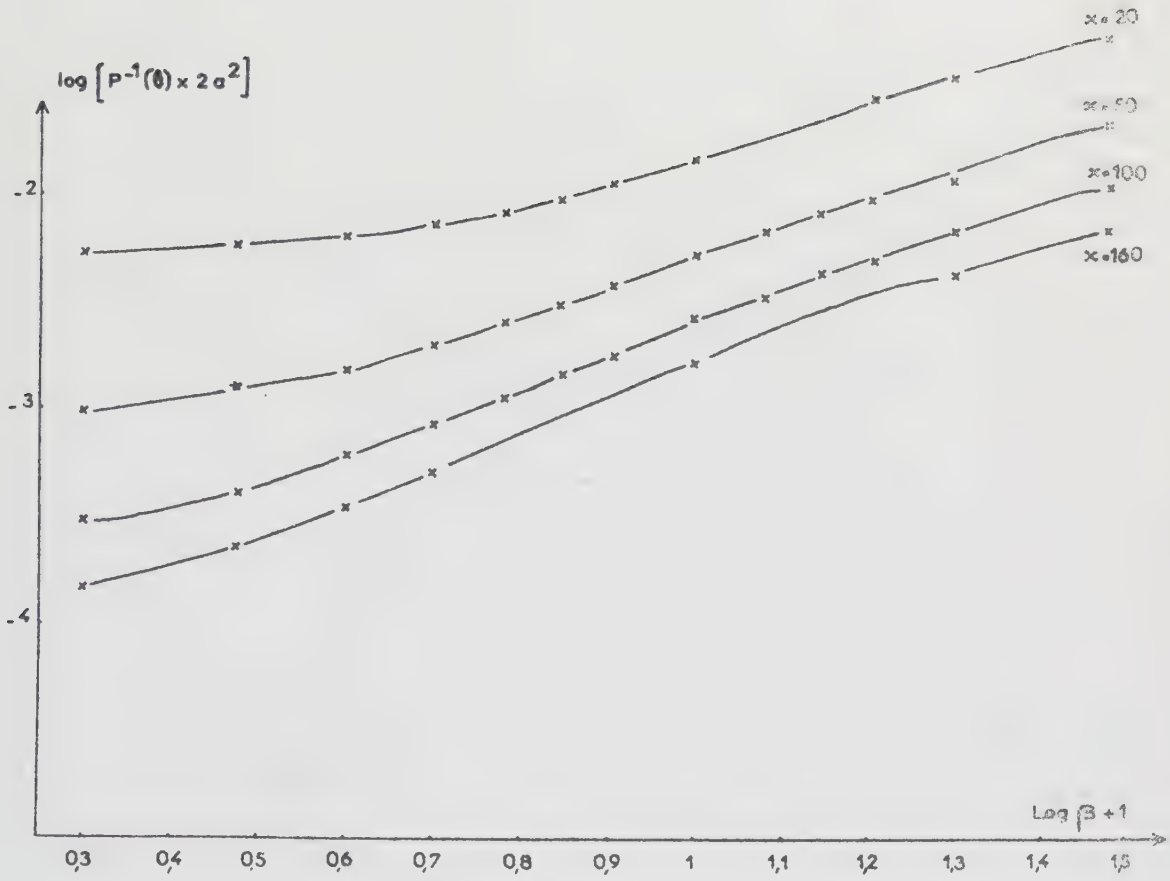



Figure 11 IV

Variations théoriques de log $2a^2/P(\theta) = f(\log \beta)$ pour différentes valeurs de x.

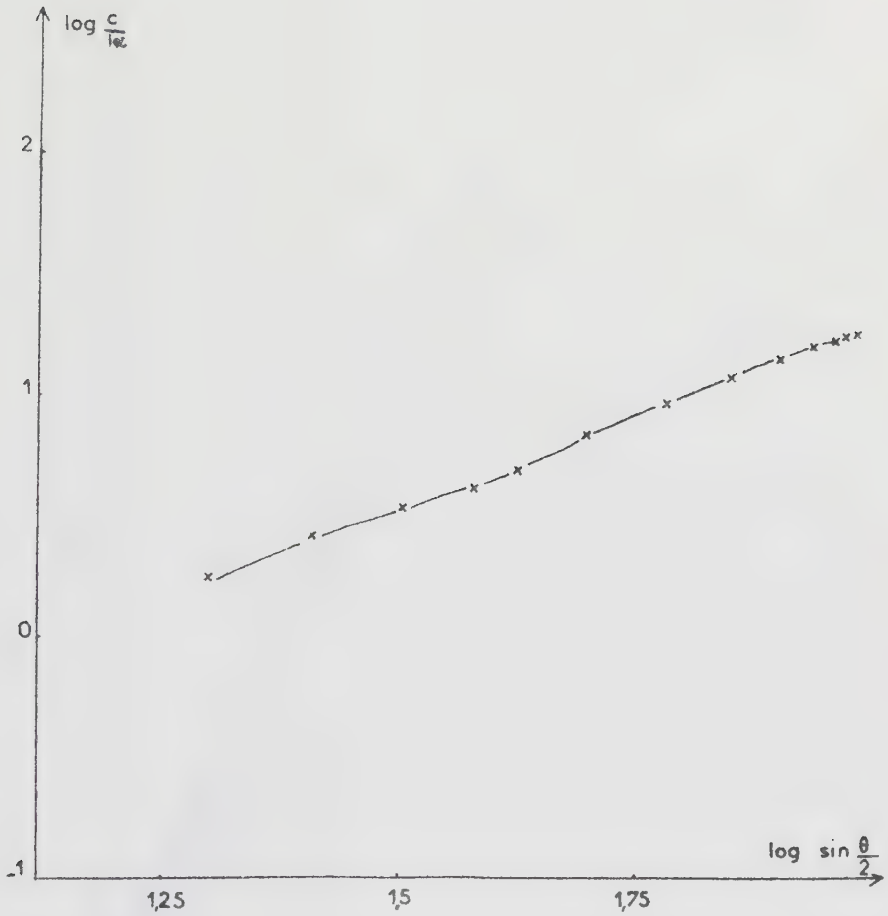



Figure 12 IV

Variations expérimentales pour un ADN $R_1$ de la fonction

$$\log C/I\alpha = f(\sin \theta/2).$$

Dans ce cas x = 100

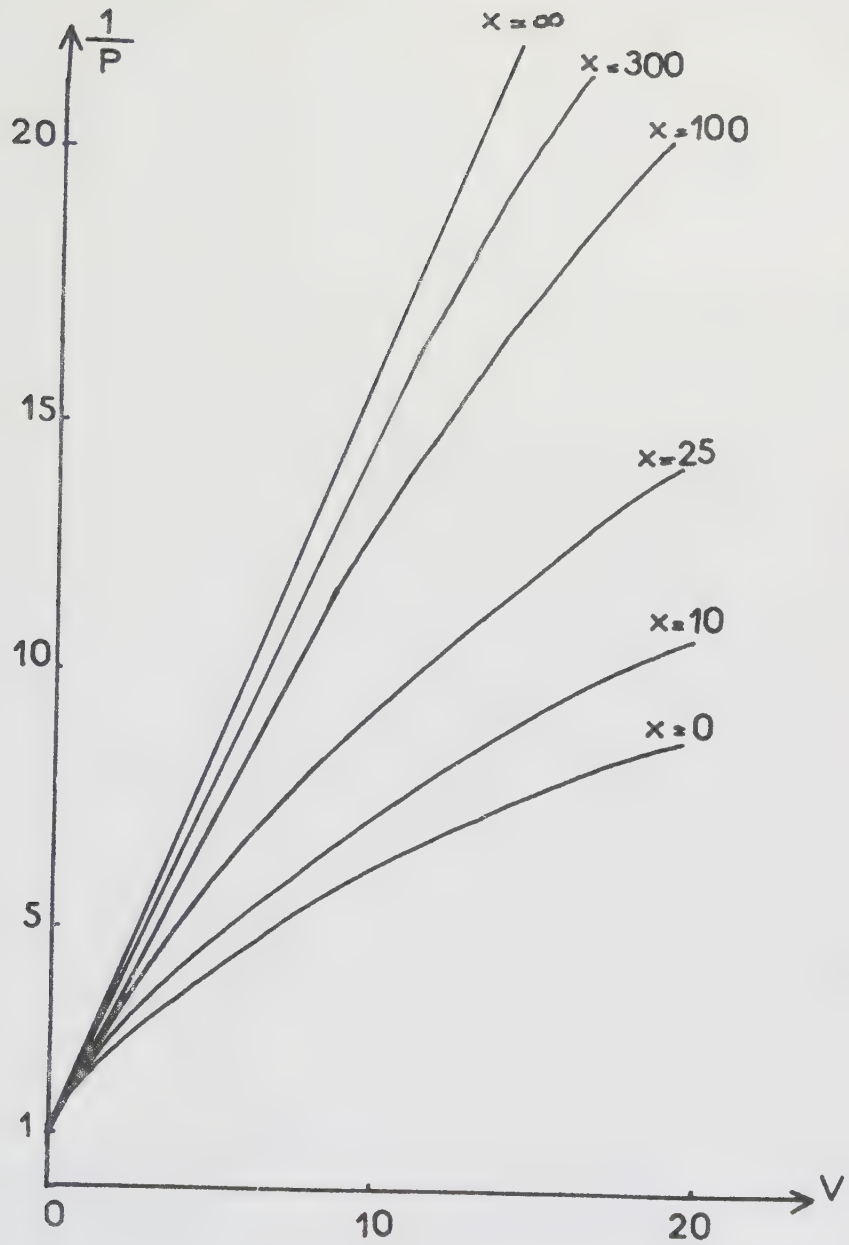



Figure 13 IV

Variations de la fonction $P = I(\psi)$ pour différentes valeurs de x selon PETERLIN (70) (cas des pelotes rigides).

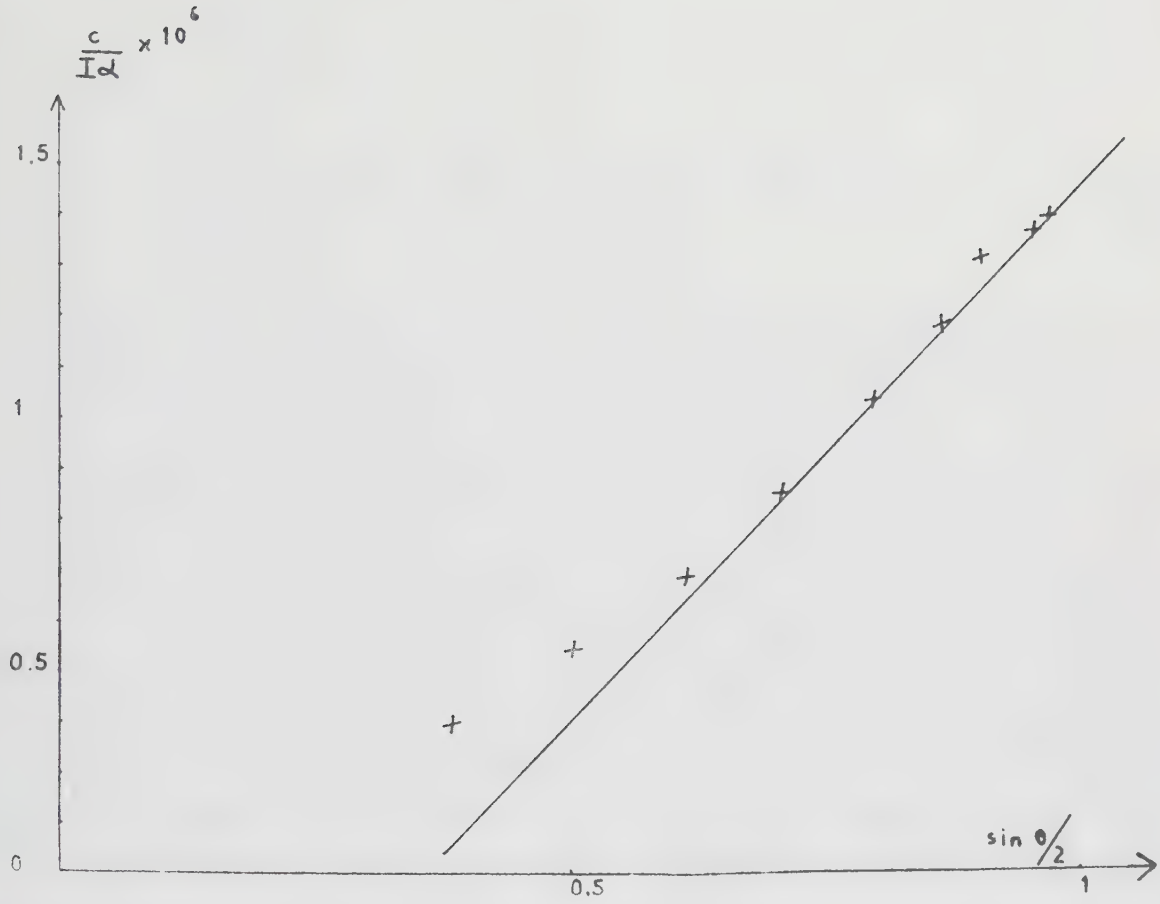



Figure 14 IV

Variations expérimentales de $c/I\alpha = f(\sin \theta/2)$.
La pente de l'assymptote permet de déterminer M/L = 200

Variations et signification de ces grandeurs dans le cas de l'ADN.

Lors de sa préparation, l'ADN peut subir au moins deux sortes de modification.

- une dépolymérisation par l'action des nombreuses nucléases contenues dans les cellules ou par les effets mécaniques (au cours du broyage des cellules par exemple).

- une dénaturation avec rupture des liaisons hydrogènesà l'intérieur de la molécule, provoquée par l'élévation de température ou l'action de différents agents dénaturants (acides, bases, métaux lourds...).

La dépolymérisation s'accompagne de modifications physico-chimiques très importantes, en particulier une chute marquée du P.M. La diffusion de la lumière est donc la méthode de choix pour détecter cette modification.

La dénaturation se traduit, en plus de la perte du pouvoir biologique, par des modifications physico-chimiques importantes : chute de la viscosité, effet hyperchromique. Le P.M. peut ne pas être modifié, le rayon de giration est généralement abaissé car les dimensions de la molécule diminuent. Les valeurs de x s'élèvent et la molécule tend à prendre une configuration de pelote statistique. Il en résulte que les grandeurs macromoléculaires déterminées par diffusion de la lumière peuvent être très utiles pour apprécier la valeur d'une préparation d'ADN. Nous avons rassemblé sur le tableau 3 IV les résultats concernant le P.M. et le rayon de giration pour tous les échantillons d'ADN dont nous avons pu disposer.

## VI - MESURE DE dn/dc.

La mesure consiste à évaluer l'augmentation de l'indice de réfraction n avec la concentration c. Celle-ci étant très faible, cette mesure doit être effectuée avec un appareil extrêmement sensible, capable d'apprécier la sixième décimale. Les réfractomètres utilisés à cet effet sont généralement du type interférentiel. La figure 15 IV représente le schéma de l'appareil que nous avons utilisé (HILGER).

Deux sources lumineuses en phase forment sur un écran un réseau d'interférences. Sur le chemin des deux faisceaux lumineux, sont placées les cuves, l'une contient le solvant, l'autre la solution. Lorsque l'indice de réfraction des deux liquides sont différents, le chemin optique (ne) de l'un des faisceaux change par rapport à l'autre. Le réseau d'interférences se déplace. Si la lumière est blanche, la raie centrale est blanche tandis que les autres sont colorées (figure 15 IV). A l'aide d'un tambour entraînant une lame d'épaisseur variable et qui s'interpose

sur le chemin d'un des faisceaux, il est alors facile de ramener une raie donnée du réseau d'interférences qui s'est déplacée avec la raie correspondante d'un réseau témoin fixe qui est formé par les parties du faisceau non interceptées par les cuves. L'angle dont on a tourné le tambour est proportionnel à la différence d'indice de réfraction entre le solvant et la solution. L'appareil peut être étalonné avec une solution de ClK. Dans ces conditions en faisant des mesures sur des solutions à différentes concentrations, il est facile de tracer la droite n=f(c), et de calculer dn/dc.

Dans le cas de l'ADN, le point le plus délicat est d'obtenir un solvant et une solution ayant réellement les mêmes concentrations salines. Pour cela, la solution est mise à dialyser contre son solvant pendant au moins huit jours. Malgré cette précaution, les conductivités étant souvent différentes nous avons dû effectuer les corrections nécessaires. Ces difficultés expliquent la discordance des résultats avec les auteurs.

Pour l'ADN, nous avons trouvé pour les différents échantillons une valeur moyenne de 0,170 u. CGS. Ce chiffre est en parfait accord avec les chiffres donnés par POUYET et HERMANS (74).

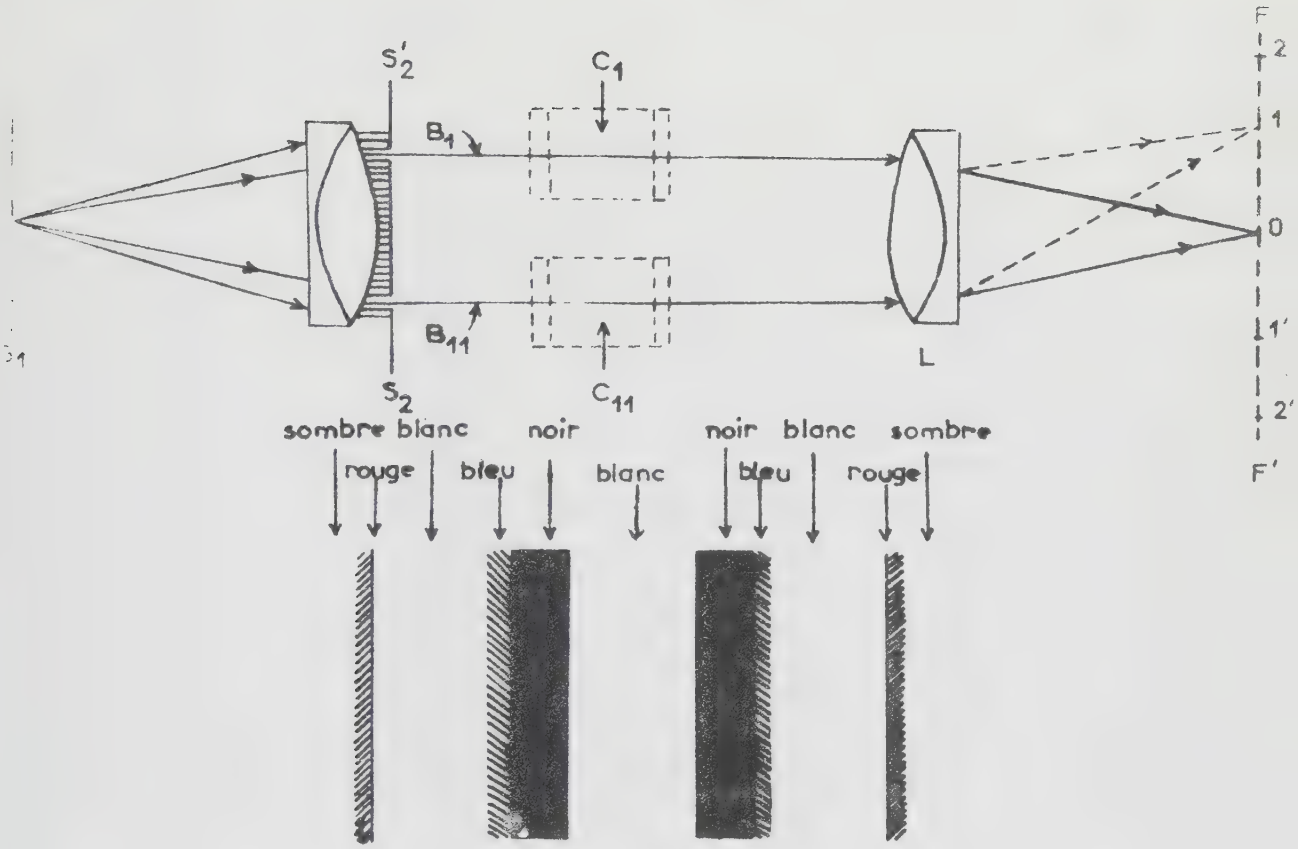



Figure 15 IV

Schéma d'un réfractomètre interférentiel

Tableau 1 IV

| $\theta$ | $\sin \theta/2$ | $\sin^2 \theta/2$ | $\alpha = \sin \theta/(I+\cos^2\theta)$ |
|---|---|---|---|
| 150 | 0,965 | 0,940 | 0,286 |
| 142,5 | 0,950 | 0,895 | 0,374 |
| 135 | 0,925 | 0,855 | 0,471 |
| 120 | 0,865 | 0,750 | 0,693 |
| 105 | 0,795 | 0,630 | 0,905 |
| 90 | 0,705 | 0,500 | 1,000 |
| 75 | 0,610 | 0,370 | 0,905 |
| 60 | 0,500 | 0,250 | 0,693 |
| 50 | 0,422 | 0,180 | 0,540 |
| 45 | 0,380 | 0,145 | 0,471 |
| 37,5 | 0,320 | 0,105 | 0,374 |
| 30 | 0,260 | 0,070 | 0,286 |
| 24 | 0,180 | 0,045 | 0,220 |

| β | I + Log β | x = 20 | x = 30 | x = 50 | x = 100 | x = 160 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | – | – 2,300 | – 2,653 | – 3,098 | – 3,700 | – 4,108 |
| 0,1 | 0 | – 2,290 | – 2,640 | – 3,071 | – 3,653 | – 4,034 |
| 0,2 | 0,30 | – 2,267 | – 2,600 | – 3,010 | – 3,521 | – 3,853 |
| 0,3 | 0,48 | – 2,232 | – 2,544 | – 2,870 | – 3,370 | – 3,639 |
| 0,4 | 0,60 | – 2,180 | – 2,470 | – 2,806 | – 3,205 | – 3,444 |
| 0,5 | 0,70 | – 2,121 | – 2,391 | – 2,693 | – 3,056 | – 3,282 |
| 0,6 | 0,78 | – 2,060 | – 2,308 | – 2,586 | – 2,930 | – 3,149 |
| 0,7 | 0,84 | – 1,996 | – 2,228 | – 2,490 | – 2,821 | – 3,036 |
| 0,8 | 0,90 | – 1,934 | – 2,152 | – 2,404 | – 2,727 | – 2,940 |
| 0,9 | 0,95 | – 1,870 | – 2,080 | – 2,326 | – 2,645 | – 2,856 |
| 1,0 | 1,00 | – 1,823 | – 2,016 | – 2,258 | – 2,574 | – 2,783 |
| 1,2 | 1,08 | – 1,716 | – 1,910 | – 2,146 | – 2,458 | – 2,666 |
| 1,4 | 1,14 | – 1,624 | – 1,814 | – 2,045 | – 2,354 | – 2,563 |
| 1,6 | 1,20 | – 1,552 | – 1,740 | – 1,970 | – 2,276 | – 2,483 |
| 1,8 | 1,25 | – 1,484 | – 1,668 | – 1,897 | – 2,204 | – 2,410 |
| 2,0 | 1,30 | – 1,422 | – 1,606 | – 1,834 | – 2,110 | – 2,346 |
| 2,5 | 1,40 | – 1,305 | – 1,487 | – 1,714 | + 2,016 | – 2,223 |
| 3,0 | 1,48 | – 1,215 | – 1,396 | – 1,622 | – 1,925 | – 2,130 |
| 4,0 | 1,60 | – 1,086 | – 1,270 | – 1,492 | – 1,793 | – 1,998 |

TABLEAU 2 (IV)

VARIATION DE Log $2a^{2/}P$ ($\phi$) EN FONCTION DE Log β

POUR DIFFERENTES VALEURS DE x

Tableau 3 IV

(n.TT. = non traité par la chymotrypsine ; T. = traité par la chymotrypsine)

| ADN | P.M. $\times 10^{-6}$ | R g A° | Méthode de préparation |
|---|---|---|---|
| $A_I$ | IO | 2800 | SIGNER ET SCHWANDER |
| $A_2$ | 10 | 3200 | " |
| $A_3$ | 10 | 2400 | " |
| $A_4$ | 13 | 2800 | " |
| $C_1$ | 7 | 2900 | PHENOL |
| $C_2$ | 7 | 3300 | PHENOL |
| $V_4$ | 9,5 | 2300 | DETERGENT |
| $V_5$ a.T | oo | 00 | " |
| $V_5$ T | 7 | 2900 | Detergent-chymotrypaine |
| $V_9$ | 23 | 3000 | SIGNER ET SCHWANDER |
| $V_{49}$ | 9 | 2900 | PHENOL |
| $V_{49}$bis | 5,5 | 2500 | Detergent |
| $V_{58}$ | 4 | 2300 | " |
| $V_{61}$ n T | 6 | 2700 | " |
| $V_{61}$ T | 4,3 | 2500 | Detergent+chymo |
| $V_{63}$ T | 8 | 2800 | DETERGENT |
| $V_{63}$ T | 8 | 2800 | " + chymo |
| $V_{69}$ | 5,2 | 2500 | PAPAINE |
| $V_{70}$ | 6 | 2700 | DETERGENT |
| $V_{72}$ | 6,2 | 2700 | " |
| $V_{74}$ | 11,3 | 3400 | " |
| $V_{91}$ | 9 | 3600 | PHENOL |
| $V_{95}$ | 9 | 3600 | " |
| $V_{97}$ | 6,5 | 2600 | PAPAINE |
| $V_{99}$ | 14 | 3500 | " |
| $V_{100}$ | 14 | 3500 | DETERGENT |
| $V_{101}$ | 11 | 3300 | PHENOL |
| $V_{102}$ | 4 | 3300 | " |
| $V_{104}$ | 13 | 3400 | PAPAINE |
| $R_1$ | 7 | 2100 | DETERGENT |
| $R_2$ | 5,8 | 2700 | " |
| $R_3$ | 5,7 | 2000 | " |
| $R_4$ | 7 | 2500 | " |
| [illegible] | 10,8 | 2100 | " |

# CHAPITRE V

## LA VISCOSIMETRIE

### Applications à l'étude des solutions macromoléculaires

-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-

DEFINITION -

Considérons dans un fluide, deux éléments de volumes adjacents. Si les deux éléments de volume sont au repos l'un par rapport à l'autre, la résultante des forces s'exerçant entre ces éléments est nulle. Si, au contraire, un des éléments est animé par rapport à l'autre d'une certaine vitesse relative sous l'effet d'une force extérieure, des forces tendront localement à s'opposer à ce déplacement et tendront à faire revenir les deux éléments de volume vers leur position d'équilibre. Cette force opposée à la force de friction $F_f$ . Supposons qu'un des éléments soit animé par rapport à l'autre d'une certaine vitesse relative dv , $F_f$ sera alors proportionnel à dv et à la surface séparant ces deux éléments de volume dS, inversement proportionnel à la distance dx séparant les centres de ces deux éléments. Le coefficient de proportionnalité reliant ces variables à la force de friction est connu sous le nom de "coefficient de viscosité ou, plus simplement, sous le nom de "viscosité $\eta$".

$$F_f = \eta \, (dv / dx) \, dS \qquad (1\ V)$$

$$\tau = F_f / dS \qquad (2\ V)$$

$\tau$ est appelé tension de cisaillement.

THEORIE DE LA VISCOSITE. EYRING (78) -

Dans cette théorie, le phénomène d'écoulement est traité de façon un peu analogue à celles des vitesses de réaction, où l'on considère que deux molécules pour réagir doivent traverser une barrière d'énergie ou énergie d'activation.

EYRING propose que les liquides contiennent des espaces libres dans lesquels les molécules peuvent se déplacer après activation. Ceci implique une structure telle que nous l'avons représentée sur la figure 1 V. On considère que les molécules se déplacent en couches parallèles et qu'elles traversent une barrière de potentiel chaque fois qu'elles trouvent une nouvelle position d'équilibre sur la même couche. Quand il n'y a aucune tension extérieure appliquée sur le système,

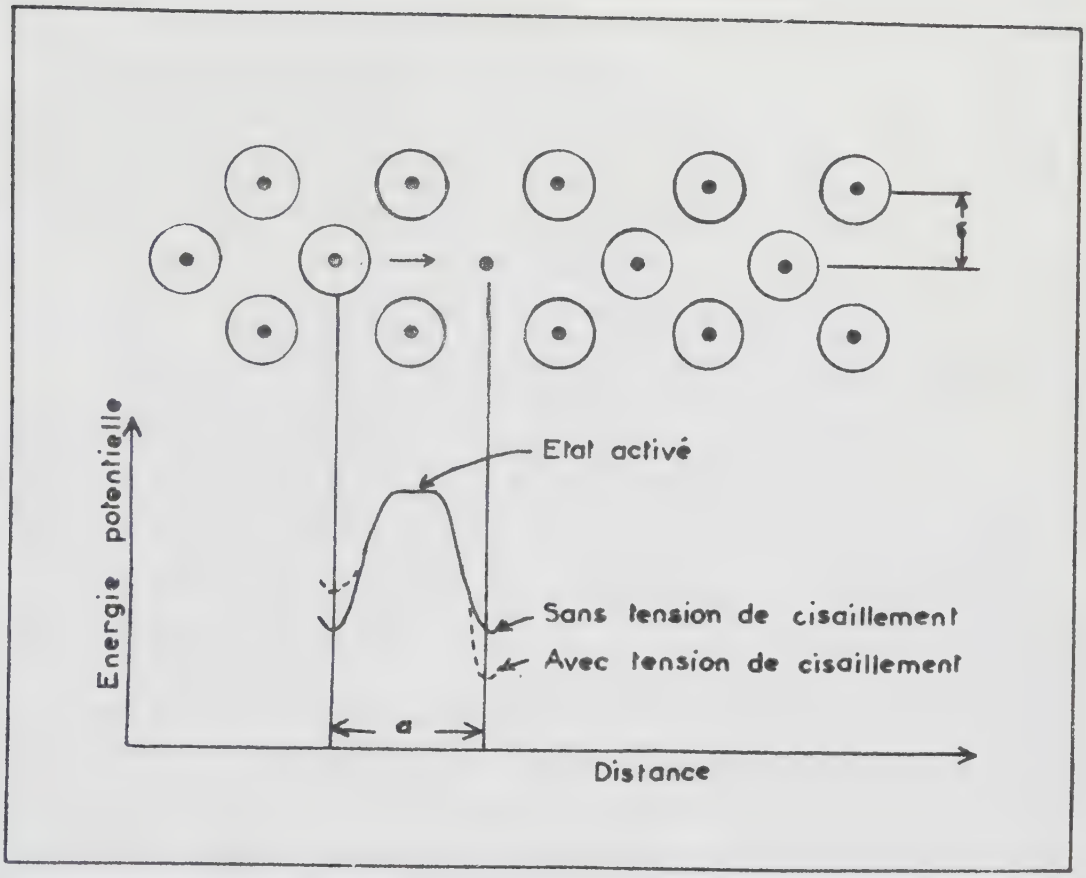

Energie potentielle
Etat activé
Sans tension de cisaillement
Avec tension de cisaillement
a
Distance

Figure 1 V.

la courbe de potentiel est supposée symétrique (courbe en trait plein sur la figure). Ceci est réalisé dans le cas de la diffusion. Quand une tension de cisaillement est exercée, la courbe de potentiel est déformée (courbe en pointillé sur la figure 1 V) et la nouvelle position d'équilibre est à un niveau de potentiel plus bas lorsque la molécule se déplace dans la même direction que la force appliquée. Pour une molécule qui se déplacerait dans la direction opposée, la nouvelle position d'équilibre serait à un niveau de potentiel plus élevé. Si les deux processus ont lieu simultanément et si $k'_f$ et $k'_r$ sont les constantes de vitesse relative dans les directions avant et opposée, la vitesse relative d'une couche par rapport aux autres couches devient :

$$v_o = a(k'_f - k'_r) = 2\, ak'_o \sinh\left(aF/2\,\delta nkT\right) \qquad (3\ V)$$

$k'_o$ est la valeur de $k'_f$ et $k'_r$ quand la force de cisaillement F agissant sur le système est nulle.

$\delta$ est la distance entre deux couches successives

n le nombre de molécules par unité de volume

k la constante de BOLTZMANN

T la température absolue.

La viscosité peut alors s'écrire :

$$\eta = F\ (v_o/\delta) = F\delta/(2\, ak'_o \sinh\left(aF/2\, n\delta kT\right) \qquad (4\ V)$$

Cette équation montre que $\eta$ va dépendre de la force de cisaillement, comme c'est le cas pour un écoulement non newtonien. Pour un écoulement newtonien, $aF/2\delta nkT$ peut être remplacé par le premier terme de son développement en série. L'expression de la viscosité devient alors

$$(\delta/a)^2\ (nkT/k'_o) = (\delta/a)^2\, nh \exp\left(\Delta F^{\ddagger}/RT\right) \qquad (5\ V)$$

où $\Delta F^{\ddagger}$ est l'énergie libre standard d'activation par mole.

Les dimensions de $\delta$ et a étant du même ordre de grandeur, on peut admettre :

$$(\delta a)^2 = 1$$

On a alors :

$$\eta = nh \exp\left(\Delta F^{\ddagger}/RT\right) \qquad (6\ V)$$

Il a été supposé que l'écoulement d'un liquide est le résultat du mouvement de molécules dans des sites vacants ou "trous". La première étape de l'écoulement est donc la formation de ces "trous". Les liaisons qui doivent être coupées entre

les molécules pour permettre la formation de ces "trous" sont de même nature que celles mises en jeu au cours de la vaporisation. Il est donc supposé que $\Delta F^{\ddagger}$ est proportionnel à l'énergie de vaporisation :

$$\Delta F^{\ddagger} = \Delta E_{vap} / 2,45 \qquad (7\ V)$$

D'après la règle de TROUTON, l'énergie de vaporisation est estimée :

$$\Delta E_{vap} = 9,4\ RT_{eb} \qquad (8\ V)$$

où $T_{eb}$ est la température d'ébullition sous 1 atmosphère. L'expression de la viscosité peut alors s'écrire :

$$\eta = nh \exp (3,8\ T_{eb} / T) \qquad (9\ V)$$

Ainsi, la viscosité d'un liquide peut être prédite à 30 % près environ lorsque le volume molaire et l'énergie de vaporisation sont connus.

ECOULEMENT NEWTONIEN - ECOULEMENT LAMINAIRE -

La viscosité, telle qu'elle a été définie, est une constante qui ne dépend pas de la vitesse d'écoulement. Ceci n'est pas une règle absolue. Pour certains liquides, l'écoulement lui-même provoque l'orientation des molécules du fluide. Cet effet se produit lorsque le fluide contient des particules très dissymétriques ou très facilement déformables. Les liquides qui, lors de leur écoulement, mettent en évidence un tel effet d'orientation, sont dits "non newtonien". Dans ce cas, la viscosité apparente du fluide dépendra de la vitesse de cisaillement ou gradient de vitesse $dv/dx$. Pour un liquide non newtonien, la viscosité apparente diminuera lorsque la vitesse d'écoulement augmentera, tandis que pour un liquide newtonien la viscosité restera constante. Dans le cas d'un liquide à écoulement non newtonien les mesures de viscosité, pour être interprétables en terme de grandeur moléculaire, devront être extrapolées à gradient de vitesse nul.

Toutes ces considérations ne sont valables que pour les écoulements laminaires. Considérons un tube formé d'une infinité de pellicules cylindriques, concentriques et infiniment minces. L'écoulement sera dit laminaire lorsque le liquide constituant une de ces pellicules cylindriques restera pendant tout l'écoulement à l'intérieur de cette pellicule. Si cette condition n'est pas réalisée, l'écoulement sera dit turbulent. Dans un conduit cylindrique, la transition de l'écoulement laminaire à l'écoulement turbulent s'effectue quand le nombre de REYNOLD (une valeur sans dimension exprimée par $2\ \rho\ a\bar{v} / \eta$, où $\rho$, $\bar{v}$ et $\eta$ sont la densité, la vitesse moyenne et la viscosité du fluide dans un tube de diamètre 2 a) dépasse 2.200.

ECOULEMENT DANS LES TUBES CAPILLAIRES ; LOI DE POISEUILLE -

Considérons un tube capillaire de rayon a et de longueur l.

Un liquide s'écoule dans ce capillaire sous l'effet d'une différence de pression $\Delta P$. La différence de pression étant suffisamment faible pour que l'écoulement soit laminaire, la vitesse limite d'écoulement est très rapidement atteinte. Considérons à l'intérieur de ce capillaire une pellicule cylindrique liquide comprise entre deux cylindres de rayons x et x + dx. Entre cette pellicule et le centre du tube le liquide va plus vite qu'entre cette pellicule et la paroi du tube. Cette pellicule est donc sollicitée par une force f dirigée vers le bas.

$$f = \eta\, S dV / dx = 2\pi\eta\, h\, (dV/dx)\, x \qquad (10\ V)$$

S = surface de cette pellicule cylindrique
V = le volume de cette pellicule
h = la hauteur de cette pellicule.

A l'extérieur de cette pellicule, le liquide va moins vite, elle est donc sollicitée par une force f' dirigée vers le haut.

Avec :

$$y = x dV / dx \qquad (11\ V)$$

$$f' = 2\pi\eta\ h(y + dy) \qquad (12\ V)$$

la résultante est donc :

$$f - f' = 2\pi\eta\, hy - 2\pi\eta\, h(y + dy) = 2\pi\eta\, hdy \qquad (13\ V)$$

Cette force est égale à la force exercée par la différence des pressions $\Delta p$ sur les bases des pellicules.

$$-2\pi\eta\, hdy = 2\pi\Delta\, pxdx \qquad (14\ V)$$

$$dy/dx = \Delta\, px/\eta h \qquad (15\ V)$$

$$\Delta p/h = \Delta P/l \qquad (16\ V)$$

$\Delta P$ étant la différence de pression entre les extrémités du capillaire de longueur l

$$dy/dx = -\Delta Px/\eta\, l \qquad (17\ V)$$

$$y = -\Delta Px^2/2\eta\, l + A \qquad (18\ V)$$

$$xdV/dx = -\Delta Px^2/2\eta\, l + A \qquad (19\ V)$$

pour $x = 0$ $\quad xdV/dx = 0$, d'où $A = 0$

$$dV/dx = -\Delta Px/2\eta l \qquad (20\ V) \qquad \text{gradient de vitesse}$$

On peut calculer un gradient de vitesse moyen :

$$I/\pi a^2 \int_0^a 2\pi\, xdx \quad dV/dx \qquad (21\ V)$$

$$\bar{g} = \Delta Pa/3\eta l \qquad (22\ V)$$

$$V = -\Delta Px^2/4\eta l + B \qquad (23\ V)$$

pour $x = a$, on a $V = 0$ d'où $B = \Delta Pa^2/4\eta l$ (24 V)

$$V = \Delta P(a^2 - x^2)/4\eta l \qquad (25\ V)$$

Soit D le débit du capillaire

$$dD = (2\pi\ xdx)V = (\pi\Delta P/2\eta l\ (a^2x - x^3)\,dx \qquad (26\ V)$$

$$D = \pi\Delta P/2\eta l \int_0^a (a^2x - x^3)\,dx \qquad (27\ V)$$

$$D = \Delta Pr^4/8\eta l \qquad (28\ V)$$

La mesure du débit dans un tube capillaire de rayon et de longueur déterminés sous une différence de pression connue fournit donc un moyen de mesure du coefficient de viscosité.

## DETERMINATION EXPERIMENTALE DE LA VISCOSITE DES LIQUIDES -

### a - Utilisation des tubes capillaires .

En pratique, on détermine le temps d'écoulement d'un volume connu sous l'effet d'une différence de pression constante. Le tube capillaire utilisé est étalonné auparavant avec un liquide de viscosité connue.

liquide de viscosité connue $\eta_1 = Kd_1t_1$ d densité

liquide de viscosité inconnue $\eta_2 = Kd_2\ t_2$ t temps d'écoulement

$$\eta_2 = \eta_1\,(d_2/d_1\ (t_2/t_1) \qquad (29\ V)$$

Dans le cas des solutions macromoléculaires, comme nous le verrons, la grandeur qui doit être souvent déterminée est la viscosité spécifique de la solution :

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_c - \eta_o}{\eta_o}$$

$\eta_c$ = viscosité de la solution à la concentration c

$\eta_o$ = viscosité du solvant

On a alors très simplement

$$\eta_{sp} = (\eta_c - \eta_o) / \eta_o = (t_c - t_o)/t_o \qquad (30\ V)$$

si $t_c$ est le temps d'écoulement dans le capillaire de la solution de concentration c et $t_o$ celui du solvant.

Cette technique de mesure très simple et ne nécessitant aucun appareillage coûteux, est très souvent utilisée, surtout dans le cas des liquides à comportement newtonien. Par contre, cette technique subit de très importantes limites dans le cas de liquides non-newtoniens. En effet, nous avons vu que le gradient de vitesse variait avec x depuis 0 jusqu'à $\Delta Pa / 2\eta l$, valeur à la paroi du tube, et qu'il était cependant possible de calculer un gradient de vitesse moyen

$$\bar{g} = \Delta Pa / 3\eta l = 8\ D / 3\pi a^3 \qquad (31\ V)$$

Cette expression nous montre aisément que, pour des liquides dont la viscosité est de l'ordre de celle de l'eau, c'est-à-dire une centipoise, le gradient de vitesse (ou, plus correctement, vitesse de cisaillement) exprimé en $sec^{-1}$ pour être faible (c'est-à-dire de l'ordre de la seconde $^{-1}$) exigera des capillaires dont les dimensions seront difficiles à réaliser. De plus, les temps d'écoulement seront trop importants. A titre d'exemple, nous donnons les caractéristiques d'un capillaire que nous avons utilisé, et nous avons calculé les modifications à faire subir à ce capillaire pour abaisser le gradient de vitesse et nous indiquons quels seraient alors les temps d'écoulement.

Dans ce viscosimètre, un centimètre cube d'eau s'écoule en 50 secondes. Le diamètre du capillaire est de 0,04 cm, sa longueur de 20 cm. La vitesse de cisaillement est donc, dans ces conditions :

$$8/3{,}14 \times 50 \times 3 \times 8\ 10^{-6} = 1910\ sec^{-1}$$

Pour abaisser cette valeur, il faut diminuer le débit par exemple en augmentant la longueur des tubes. Même en enroulant les tubes en spirale, il serait difficile de dépasser 200 cm. Dans ce cas la vitesse de cisaillement ne serait divisée que par un facteur de 10. Il n'est pas pratiquement possible de diminuer le diamètre des capillaires au-dessous de cette valeur, car ils deviendraient difficiles à nettoyer et ils se boucheraient très facilement. On pourrait imaginer à l'aide de systèmes très compliqués d'abaisser la pression d'écoulement. De toutes façons, et dans tous les cas, le débit deviendrait beaucoup trop faible, et les mesures dureraient très longtemps. Dans notre cas, pour obtenir une vitesse de cisaillement de 5 $sec^{-1}$ par exemple il faudrait obtenir un débit de 1 cm3 en plus de 4 heures. Pour les liquides dépendant peu du gradient de vitesse, on peut toutefois utiliser un capillaire tel que nous l'avons représenté sur la figure 2 V. A chaque ampoule correspond une vitesse de cisaillement différente. Il est donc possible en théorie d'extrapoler les mesures à gradient nul.

Il convient d'attirer l'attention sur le fait que, pour la mesure de la viscosité dans les capillaires, tous les liquides devront être auparavant centrifugés ou filtrés afin d'éliminer toute poussière ou fibre capable d'obstruer partiellement les conduits.

b - Viscosimètre type "COUETTE.

Considérons deux cylindres concentriques de hauteur h. Le cylindre intérieur de rayon r est suspendu à un fil de torsion. Le cylindre extérieur de rayon R contient un liquide de viscosité $\eta$ et tourne à une vitesse de n tours par seconde. Sous l'effet des forces de viscosité, le cylindre intérieur tourne d'un certain angle $\alpha$. A l'équilibre, le moment du couple de torsion est égal au moment du couple des forces de viscosité.

$$K_\alpha = fr \qquad (32\ V)$$

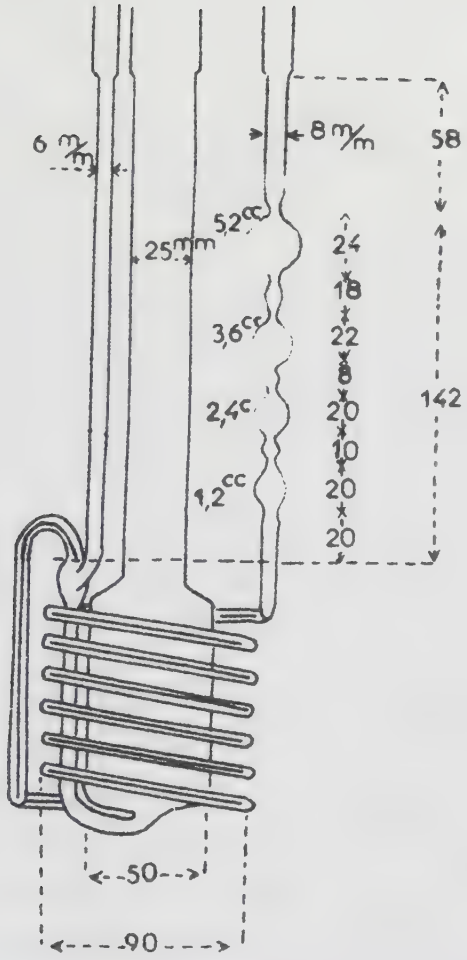
$$f = \eta S \Delta v / \Delta x \qquad (33\ V)$$

$$v = 2\pi Rn \qquad (34\ V)$$

$$S = 2\pi[(R + r)/2]\ h \qquad (35\ V)$$

$$\Delta v/\Delta x = 2\pi Rn/(R - r) \qquad (36\ V)$$

$$f = \eta \frac{2\pi Rh\,[(R + r)/2]\,2\pi n}{R - r} \qquad (37\ V)$$




SCHEMA D'UN VISCOSIMETRE CAPILLAIRE
PERMETTANT DES MESURES A PLUSIEURS GRADIENTS

Figure 2 V

Pour un appareil donné, on a :

$$f = \eta An \qquad (38\ V)$$

où $A$ est une constante de l'appareil

d'où :

$$\eta Anr = K\alpha = \eta B \qquad (39\ V)$$

$B$ ; constante pour des conditions expérimentales données.

$$\eta = K\alpha / B \qquad (40\ V)$$

La déviation du fil de torsion est donc proportionnelle à la viscosité. On peut étalonner l'appareil avec un liquide de viscosité connue. Pour mesurer la viscosité spécifique, c'est extrêmement simple, il sufit de mesurer les déviations du fil de torsion.

En effet, on a ;

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_c - \eta_o}{\eta_o} = \frac{K'\alpha_c - K'\alpha_o}{K'\alpha_o} = \frac{\alpha_c - \alpha_o}{\alpha_o} \qquad (41\ V)$$

Nous décrirons maintenant l'appareil que nous avons utilisé et qui est une modification imaginée par LECOMTE du NOUY (figure 3 V) . L'appareil comprend comme l'appareil de COUETTE un cylindre intérieur et extérieur. Le cylindre intérieur est suspendu à un ruban de torsion lui-même accroché à un cadre du type de celui d'un galvanomètre où peut passer un courant d'intensité $i$ . Ce cadre est situé dans l'entrefer d'un aimant. Grâce à ce système, il est possible de créer un couple de forces électromagnétiques dont le sens est opposé à celui du couple des forces de viscosité. La valeur du moment de ce couple est proportionnelle à l'intensité du courant traversant le cadre. A l'aide d'un rhéostat il est très simple de faire varier $i$ Jusqu'à une certaine valeur $i_o$ pour laquelle la déviation du ruban de torsion est nulle. Le moment du couple de torsion est alors nul, et le moment du couple des forces électromagnétiques est égal au moment du couple des forces de viscosité. Il suffit de remplacer $\alpha$ par $i_o$ dans le calcul exposé ci-dessus. On a donc ;

$$\eta = Ki_o / B \qquad (42\ V)$$

La mesure du courant traversant le cadre remplace dans ce cas la mesure de la déviation du fil de torsion dans le cas du système de COUETTE.

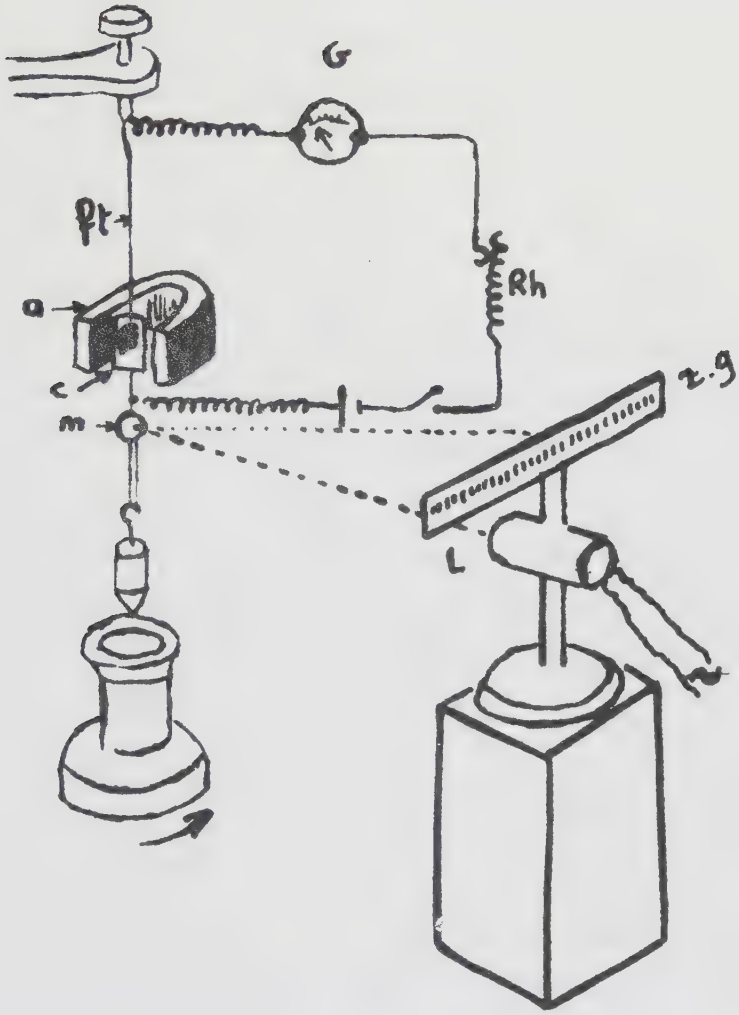



Figure 3 V

Microviscosimètre LECOMTE du NOÜY, CHAIX et VERAIN

La sensibilité d'un tel appareil est excellente, il est alors possible de faire tourner le cylindre extérieur à une vitesse suffisamment faible pour obtenir une vitesse de cisaillement très faible. Dans ce cas, la vitesse de cisaillement dans l'entrefer des cylindres est sensiblement constante et définie selon l'équation 36 V. Dans notre cas, avec les cuves que nous avons utilisées, la vitesse de cisaillement était de 15 $sec^{-1}$. Ces cuves étaient en acier inoxydable et ce métal n'avait aucun effet sur la viscosité des solutions d'ADN.

Il convient également de signaler le viscosimètre de HOOPLER. Son principe repose sur la loi de STOKES, c'est-à-dire sur la mesure de la vitesse de sédimentation de sphères dans un liquide vis queux. Nous n'insisterons pas sur ce type de méthode qui est principalement utilisée pour la mesure de la viscosité de liquides très visqueux.

De plus, l'influence de la température sur la viscosité étant très importante comme le montre la théorie de la viscosité, toutes les mesures devront être faites dans une enceinte parfaitement thermostatée, au dixième de degré près au moins.

## VISCOSITE INTRINSEQUE DES POLYMERES : RELATION AVEC LEURS GRANDEURS MOLECULAIRES -

### DEFINITIONS

La valeur intéressante n'est pas la viscosité propre des solutions du polymère, mais plutôt l'épaississement relatif du solvant dû à ce polymère dissous.

STAUDINGER définit ainsi la viscosité spécifique ;

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_c - \eta_o}{\eta_o} = \eta_c / \eta_o - 1 = \eta_r - 1 \qquad (43\ V)$$

$\eta_o$ = viscosité du solvant pur

$\eta_c$ = viscosité de la solution de concentration c

$\eta_r$ = viscosité relative de la solution

$\eta_{sp}$ = viscosité spécifique de la solution.

Expérimentalement, il a été trouvé que la viscosité des solutions de polymère variait avec les facteurs suivants :

- la forme, la taille, la masse des molécules en solution ou des particules en suspension, et pour des systèmes dispersés suivant la distribution de ces valeurs ;

- le volume réellement occupé par les particules en solution ; effet de solvatation ;

- la flexibilité interne et la déformabilité des particules dans la solution ;

- les conditions thermodynamiques du système ;

- la présence de champs électriques ;

- la concentration.

Connaissant la viscosité des solutions de polymère dans des conditions précises et déterminées, comment calculer la forme, la taille et la masse desmolécules en solution, voilà quel était le problème posé aux théoriciens. Les calculs reliant la viscosité des solutions aux caractéristiques moléculaires sont généralement effectués en considérant la perturbation entraînée dans l'écoulement par une particule unique. Il faut donc étudier le comportament d'une solution et extrapoler ce comportement à concentration nulle.

De nombreuses considérations théoriques montrent que la viscosité spécifique doit varier avec la concentration comme :

$$\eta_{sp} = (\eta)\, c\, (1 + k_1 (\eta)\, c + k_2 (\eta)^2 c^2 + k_3 (\eta)^3 c^3 \ldots\ldots) \qquad (44\ V)$$

Pour de nombreux polymères et pour des concentrations faibles, le comportement des solutions peut être représenté avec une approximation satisfaisante par l'équation :

$$\eta_{sp}/c = \eta_{red} = (\eta) + k_1 (\eta^2) c \qquad (45\ V)$$

$(\eta)$ est défini comme la viscosité intrinsèque. Si l'on porte sur un graphique les valeurs de $\eta_{red}$ en fonction de $c$, on obtient une droite dont l'intersection avec l'axe des ordonnées est $(\eta)$. On a donc :

$$(\eta) \equiv \lim_{c \to 0} \eta_{sp}/c \equiv \lim_{c \to 0} \log \eta_{red}/c \qquad (46\ V)$$

Chaque fois qu'il existera un effet de concentration, c'est la viscosité intrinsèque qui sera reliée aux grandeurs moléculaires.

Les premiers calculs reliant les grandeurs moléculaires d'une particule à la viscosité spécifique de ses solutions furent faits par EINSTEIN.

THEORIE D'EINSTEIN -

Pour des particules rigides, sphériques, sans interaction avec le solvant et dont les dimensions sont faibles devant celles du viscosimètre mais grandes devant celles des molécules du solvant, la viscosité spécifique est donnée par la relation :

$$\eta_{sp} = 2,5\ V \qquad (47\ V)$$

V représente la fraction de volume du corps dissous.

Si $d_1$ et $d_2$ sont les densités du solvant et du corps dissous, c la concentration :

$$c = 100\ V\ d_2 / d_1 \qquad (48\ V)$$

d'où :

$$\eta_{sp} = 0,025\ c\ d_1 / d_2 \qquad (49\ V)$$

$d_1 / d_2$ est le plus souvent compris entre 0,8 et 1,2. Si la concentration est de 1 g/100 cm3, $\eta_{sp}$ devrait être de 0,02 à 0,03 si les particules se comportaient comme des sphères rigides. En réalité pour la plupart des polymères, la viscosité spécifique est de 20 à 200 fois supérieure à celle que prévoit cette théorie. Toutefois, lorsque l'on est sûr que toutes les hypothèses de départ sont réalisées, cette théorie se vérifie entièrement. C'est le cas en particulier pour des particules sphériques de soufre, suspension de particules sphériques de verre ou de gomme gutte.

Pour expliquer les différences observées dans le cas des polymères, il faut admettre qu'une ou plusieurs des hypothèses fondamentales ne sont pas vérifiées.

- soit, les particules ne sont pas sphériques. Le calcul a été fait pour des ellipsoïdes par SIMHA;

- soit, les particules ne sont pas rigides et peuvent se déformer dans le solvant, soit les particules ne sont pas indépendantes du solvant, le solvant pouvant circuler à travers les particules (cas des particules dites "perméables").

CAS DES ELLIPSOIDES. SIMHA (30 -

SIMHA a étendu le calcul d'EINSTEIN pour des particules en forme d'ellipsoïde. Il vient alors :

$$\eta_{sp} = \nu V$$

qui est égal dans l'équation d'EINSTEIN à 2,5 est ici plus grand.

Pour des ellipsoïdes allongés (rotation autour du grand axe de l'ellipse

$$\nu = J^2/5\ (1\ n2\ J - 1/2) + 14/15 \qquad (51\ V)$$

Pour des ellipsoïdes aplatis (rotation autour du petit axe de l'ellipse

$$\nu = (16/15)\ (J/\tan^{-1} J) \qquad (52\ V)$$

J étant le rapport des axes a/b, ces équations ne s'appliquent que lorsque K est plus grand que zéro.

Les figures 4 V et 5 V montrent les variations de $\nu$ en fonction de a/b.

CAS DES POLYMERES NON RIGIDES

L'objectif principal dans ce cas est de déterminer à partir de la viscosité intrinsèque le poids moléculaire du polymère. Une relation empirique permet très souvent de résoudre ce problème de façon satisfaisante.

$$(\eta) = K\ M^{\alpha} \qquad (53\ V)$$

ou

$$\log (\eta) = \alpha \log M + \log K \qquad (54\ V)$$

Dans ce cas log $(\eta)$ varie donc linéairement avec log M. Il suffit donc dans ce cas pour un polymère donné de mesurer $(\eta)$ et M par diffusion de la lumière sur des échantillons de PM différents et de tracer la droite log $(\eta) = f(\log M)$. Cet étalonnage terminé, la seule mesure de $(\eta)$ permettra de calculer M. C'est ainsi que l'on peut représenter de façon très satisfaisante le comportement rhéologique du polyisobutilène dans quatre solvants différents. Le poids moléculaire calculé selon cette méthode est alors pondéré comme ;

$$\bar{M} = \left[ \frac{\sum_i n_i\ M_i^{I + \alpha}}{\sum n_i\ M_i} \right]^{I + \alpha} \qquad (55\ V)$$

$\alpha$ est compris entre 0,5 et 0,7 pour des macromolécules linéaires et souples.
$\alpha$ est dans ce cas d'autant plus près de 0,5 que la particule est moins déployée.

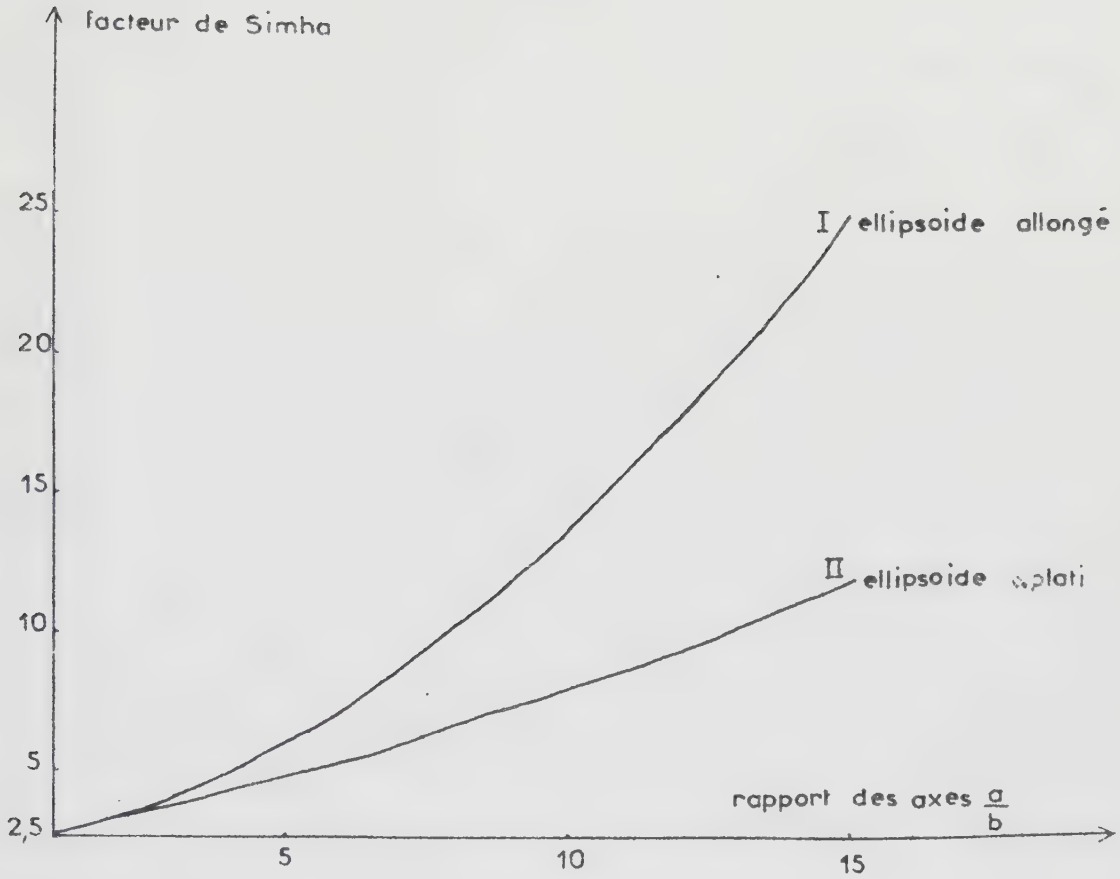



Figure 4 V

Facteur de SIMHA pour des ellipsoïdes dont le rapport des axes a/b est relativement petit.

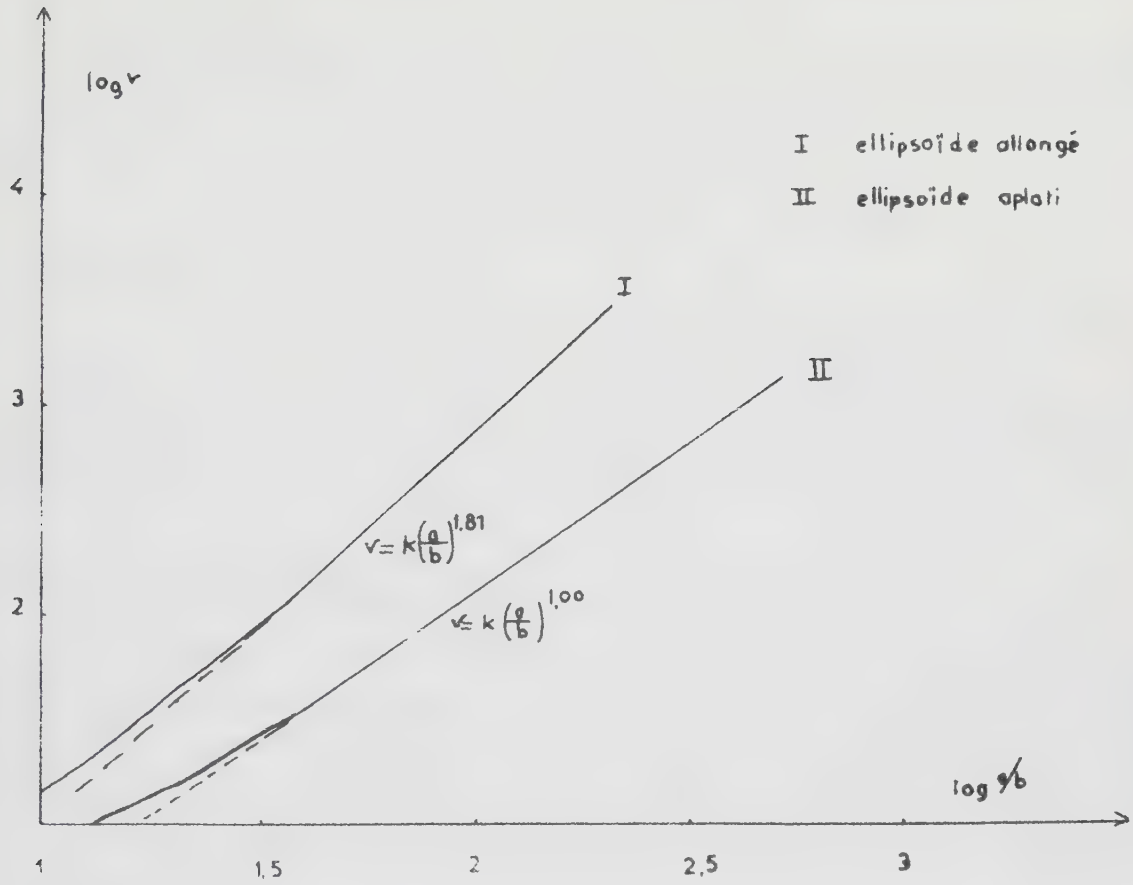



Figure 5 V

Représentation logarithmique du facteur de SIMHA pour des grandes valeurs du rapport des axes a/b de l'ellipsoïde.

$\alpha$ est compris entre 0,8 et 1 pour des particules linéaires mais plus rigides. $\alpha$ est plus grand que 1 pour des bâtonnets très rigides.

La première approche théorique faite consiste à assimiler la pelote moléculaire du point de vue hydrodynamique à une sphère équivalente de rayon $R_e$ , $R_e$ étant relié au rayon de giration $R_G$ par la relation :

$$R_e = R_G \times \xi \qquad (56\ V)$$

On a alors :

$$(\eta) = 0{,}025.\ 4\pi R_e^3 / 3\ M = 0{,}025.\ 4\pi \xi^3\ R_G^3 / 3M \qquad (57\ V)$$

Si les particules peuvent être représentées de cette façon, on doit observer une proportionnalité entre $(\eta)$ et $R_G^3/M$ , ces deux dernières valeurs pouvant être mesurées par diffusion de la lumière.

THEORIE DE BRINKMAN DEBYE ET BUECHE B.D.B. (8) (9) (20) -

Dans les calculs effectués par B.D.B., on considère la chaîne moléculaire formée de petites perles reliées entre elles à la façon d'un collier de perles, ce collier pouvant être plus ou moins rigide selon l'articulation entre deux perles successives. B.D.B. supposent que le mouvement d'une perle n'affecte pas le mouvement des autres et que ces perles sont distribuées de façon uniforme dans une sphère de rayon $R_e$ .

Pour tenir compte de la façon dont la sphère est pénétrée par le solvant, ils introduisent un paramètre d'écran $\sigma$ :

$$\sigma = R_e / L \qquad (58\ V)$$

où L représente la profondeur à laquelle le solvant peut pénétrer librement dans la sphère.

Dans ces conditions ;

$$(\eta) = \Phi(\sigma)\, 4\pi R_e^3 / 3M \qquad (59\ V)$$

$\Phi(\sigma)$ est une fonction qui représente le facteur de friction hydrodynamique qui, dans le cas de la théorie d'EINSTEIN, valait 0,025. La fonction $\Phi(\sigma)$ est calculée :

$$\Phi(\sigma) = \frac{5}{2}\ \frac{1 + 3/\sigma^2 - (3/\sigma)\coth\sigma}{1 + 10/\sigma^2 + 30/\sigma^4\ (3/\sigma)\coth\sigma} \qquad (60\ V)$$

Pour les petites valeurs de $\sigma$, c'est-à-dire pour L grand, c'est-à-dire dans le cas des particules perméables, cette fonction peut s'écrire ;

$$\Phi(\sigma) = (\sigma^2/10)(1 - 2\sigma^2/35 + \dots) \qquad (61\ V)$$

Ceci conduit à la règle empirique de STAUNDIGER ;

$$(\eta) = KM \qquad (62\ V)$$

Par contre, lorsque $\sigma$ est grand, cas des particules colmatées, on a ;

$$\Phi(\sigma) = (5/2)(1 - 2\sigma^2/35 + \dots) \qquad (63\ V)$$

ce qui conduit à l'équation d'EINSTEIN modifiée par KUHN ;

$$(\eta) = 0{,}025\ \frac{4\ Re^3}{3} \times \frac{I}{M} \qquad (64\ V)$$

De cette manière, la théorie de B.D.B. rend compte des variations de $\alpha$ dans l'équation 53 V de 0,5 à 1 (quand $M \neq \bar{r}^2$ où $\bar{r}^2$ est le carré moyen de la distance entre les deux extrémités de la pelote moléculaire). $\sigma$ détermine alors le rapport entre $R_e$ et $\bar{r}^2$, $\alpha$ dépend alors du degré d'enroulement de la pelote, de sa perméabilité, et donc des interactions entre les éléments de la chaîne.

## APPLICATION DE LA VISCOSIMETRIE AU CAS DE L'ADN -

Nous avons vu à propos de la diffusion de la lumière que le modèle représentant le mieux l'ADN était la pelote vermiforme de PETERLIN. Le calcul de ce modèle n'a pas encore été fait pour la viscosité. Aucun des modèles existants d'ailleurs actuellement ne représente exactement le comportement de cette molécule. Les théories pour les pelotes ne sont qu'approchées. L'application de ces théories aux cas de l'ADN a été discutée par HERMANS et HERMANS (35), DOTY et coll. (23) ont établi une relation empirique à la suite d'études sur les fragments soniques de l'ADN.

$$(\eta) = 1{,}45 \times 10^{-4}\ M^{1,12} \qquad (65\ V)$$

Dans le cas de l'ADN, il faut particulièrement insister sur le comportement non-newtonien des solutions. La figure 6 V montre les variations de la viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement selon ZIMM (110). On pourra remarquer sur cette figure que la dépendance de la viscosité mesurée avec la vitesse de cisaillement à laquelle sont effectuées les mesures est particulièrement marquée. Il est donc très important que non seulement les mesures de viscosité soient faites à une vitesse de cisaillement aussi basse que possible mais que les différentes valeurs soient de plus extrapolées à une vitesse de cisaillement nulle. De plus les variations de la viscosité mesurée se produisent pour les valeurs basses de la vitesse de cisaillement et ces variations ne sont pas linéaires. Des mesures très précises et très rigoureuses ne sont donc pratiquement pas possibles à l'aide de tubes capillaires où les vitesses de cisaillement sont comprises entre 100 et 1.000 sec $^{-1}$ au mieux.

- - - -

N.B. - Nous n'avons exposé ici que la théorie de DEBYE BRINKMAN et BUECHE qui permet de représenter avec une bonne approximation le comportement rhéologique des polymères non rigides en solution. D'autres théories ont été proposées. Elles ne s'appliquent généralement qu'à des systèmes plus particuliers. Pour une discussion générale de toutes les théories on pourra se reporter à SIMHA (30) .

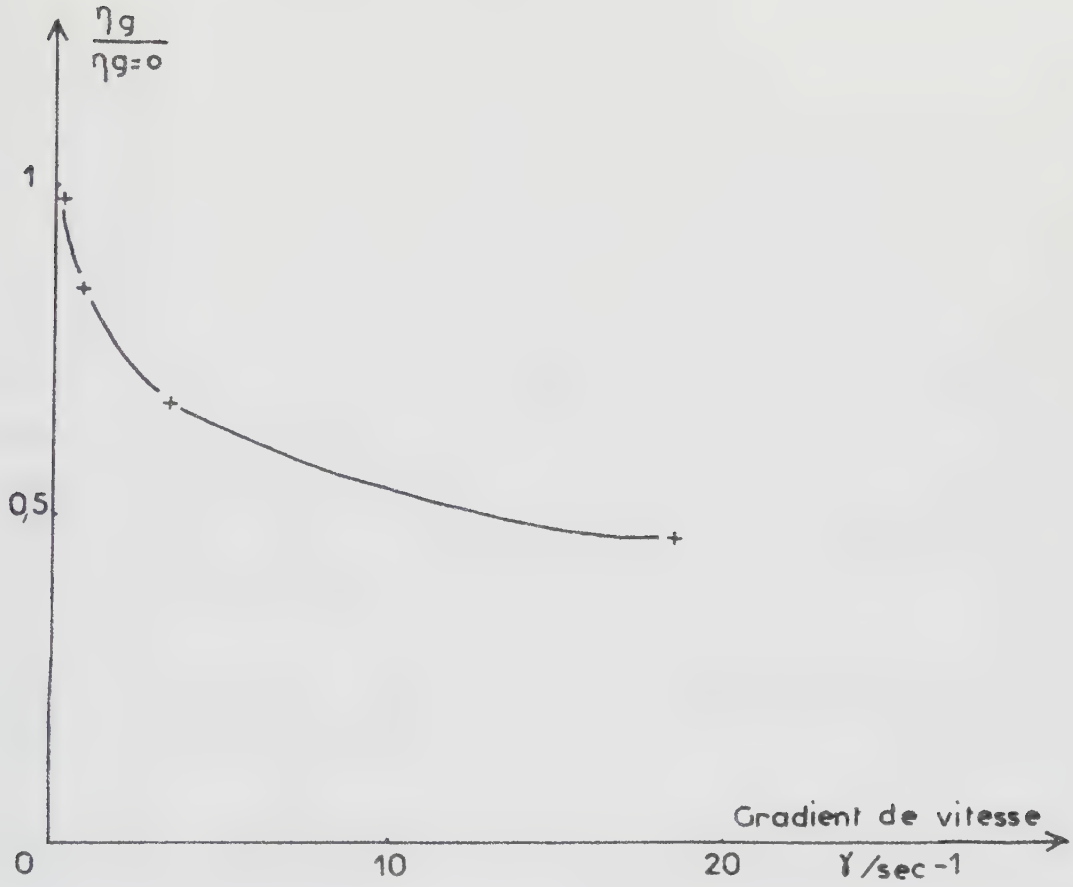



Figure 6 V

Effet du gradient de vitesse (ou vitesse de cisaillement) sur la viscosité des solutions d'ADN selon ZIMM (110)

$\eta_g$ = viscosité mesurée au gradient de vitesse g

$\eta_{g=0}$ = viscosité mesurée à gradient de vitesse nul.

# C H A P I T R E VI

## ETUDE DE LA FORMATION DE COMPLEXES ENTRE L'ADN ET LE LYSOZYME

## RESULTATS EXPERIMENTAUX

Une des premières étapes de la préparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) à partir de cellules est l'extraction des nucléoprotéines. Parmi les propriétés de ces nucléoprotéines les mieux connues sont celles de solubilité. Les nucléoprotéines sont entièrement solubles dans l'eau distillée, mais une partie précipite lorsqu'on y ajoute progressivement du chlorure de sodium. Ceci permet de distinguer deux sortes de nucléoprotéines ; les désoxyribonucléoprotéines (DNP) insolubles et les ribonucléoprotéines (RNP) solubles, la concentration en chlorure de sodium étant environ 0,15 M. Pour des concentrations en celui-ci supérieures à 0,6 M, les DNP repassent en solution et il faut atteindre des concentrations supérieures à 4 M pour obtenir à nouveau un précipité qui contient les protéines des DNP et les RNP, tandis que l'ADN reste en solution.

Dans le présent travail nous allons porter notre attention uniquement sur les propriétés des DNP. Nous pouvons étudier les propriétés de solubilité de cette substance de la façon suivante ;

Partons d'une solution de DNP en solution dans du chlorure de sodium 2 M diminuons la concentration saline de cette solution. Nous nous attendons à trouver, à mesure que la concentration saline diminue, une zone de précipitation, puis une zone de dissolution lorsque la concentration saline sera suffisamment faible (inférieure à $\frac{M}{1.000}$). Or, on observe bien, qu'en dessous d'une concentration inférieure à $\frac{M}{10}$ environ, un précipité apparaît, mais celui-ci en général ne se redissout pas lorsqu'on arrive aux très faibles concentrations salines, bien que les DNP soient pratiquement en présence d'eau distillée (17).

Cette irréversibilité de l'action de la concentration saline vis-à-vis de la solubilité des DNP amène à se poser la question suivante : Y a-t-il des conditions nécessaires et suffisantes pour obtenir à partir de leurs constituants des DNP dans un état comparable à celui qu'ils possèdent lors de leur extraction dans l'eau distillée, ou au contraire faut-il faire appel pour cela à des processus biologiques (par exemple, enzymatiques) ?

Nous nous limiterons à l'examen de la première partie de la question posée ci-dessus et nous allons développer notre façon d'aborder le problème.

Il est connu que les DNP sont constitués en parties à peu près égales d'ADN et de protéines, que parmi celles-ci les quatre cinquièmes sont des histones, des protéines fortement basiques, et l'autre cinquième contient des protéines encore mal connues mais non basiques (1) (67) .

Pour étudier le caractère des liaisons entre l'ADN et les protéines, plusieurs chercheurs ont étudié en fonction de la force ionique et du pH, les domaines de stabilité de complexes entre ADN et sérum albumine (31) (93) , ADN-chymotrypsine (37) , ADN-TRYPSINE (38) . Il ressort de ces travaux que les liaisons entre l'ADN et les protéines sont du type électrostatique. Mais en général, aux faibles forces ioniques, ces complexes ne sont pas solubles, ce qui les distingue des nucléoprotéines naturelles.

Les protéines des systèmes ci-dessus n'ayant pas le caractère basique des histones, nous avons entrepris une étude analogue du système ADN-lysozyme, le lysozyme étant une protéine nettement basique. Le travail que nous présentons à ce sujet est préliminaire à une étude plus complète de ce système. Il est destiné surtout à préciser les modalités d'emploi des techniques utilisées et à nous révéler les aspects divers que peuvent présenter les associations ADN-lysozyme.

## MODALITE D'ETUDE DU SYSTEME ADN-LYSOZYME -

### a - Généralités

L'ADN et le lysozyme ont des masses moléculaires respectives de $10^7$ et $10^4$ g, c'est-à-dire que pour des poids égaux de chacun des constituants, il y a mille fois plus de particules de lysozyme que d'ADN. Mais il ne faut pas oublier que, si du point de vue composition globale, l'ADN et le lysozyme sont des constituants bien définis, rien ne s'oppose à ce que, dans des phénomènes de solubilité, ils apparaissent hétérogènes, comme c'est le cas de la plupart des composés biologiques. Les associations possibles sont celles des constituants avec eux-mêmes ou entre eux, les unes n'excluant pas les autres. Parmi les techniques d'études possibles nous avons retenu celle de la diffusion de la lumière, car elle est généralement très sensible aux phénomènes d'agrégation. Mais afin de savoir si les phénomènes d'agrégation observés intéressent l'ensemble des

TABLEAU I VI

CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES DES ADN UTILISES

| Echantillon | P.M. | $R_G$ ( Å ) | ( $\eta$ ) C.G.S. | $\varepsilon$ | $\mu$ |
|---|---|---|---|---|---|
| A 1 | $10^7$ | 2.800 | | 6.600 | 0,6 |
| A 2 | $10^7$ | 3.200 | | 6.700 | 0,2 - 0,3 |
| A 3 | $10^7$ | 2.400 | 10.800 | 6.600 | 0,1 - 0,05 |
| A 4 | $1,3 - 10^7$ | 2.800 | 11.000 | 6.700 | $10^3 - 10^{-4}$ |

$\varepsilon$ = coefficient d'extinction rapporté à 1 atome de phosphore

$\mu$ = forces ioniques auxquelles les mesures ont été effectuées

constituants ou une fraction d'entre eux, nous avons effectué sur certaines solutions des ultracentrifugations, des mesures de viscosité et de biréfringence d'écoulement.

Dans ce travail nous avons étudié principalement l'influence de la concentration en chlorure de sodium sur les possibilités d'association entre lysozyme et ADN, cela pour différents rapports des constituants et en maintenant le plus possible le pH à une valeur constante, voisine de 8,5. A ce pH, il est facile de connaître l'état d'ionisation des différents couples acide-base des constituants.

b - Préparation des solutions

Les solutions d'ADN et de lysozyme sont préparées séparément. La solution d'ADN contient le tampon et la quantité nécessaire de ClNa. La solution de lysozyme est ajoutée à la solution d'ADN en agitant constamment, on évite ainsi au maximum la formation d'agrégats parasites difficiles à redissoudre.

Dans certaines conditions, il apparaît un précipité. Après séparation du précipité par centrifugation, les solutions surnageantes sont analysées de la façon suivante ; la concentration en lysozyme étant déterminée par la méthode de LOWRY (64 ) , celle de l'ADN est déduite de l'absorption de la solution mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre JOBIN et YVON à la longueur d'onde de 2.600 Å, corrigée de l'absorption due au lysozyme. Cette méthode est nettement plus sûre que celle consistant à évaluer les concentrations des constituants à partir de l'absorption de la solution pour deux longueurs d'onde (2.800 et 2.600 Å par exemple) , car l'ADN a un coefficient d'absorption plusieurs fois supérieur à celui du lysozyme.

Pour analyser le précipité, on le redissout dans un volume connu de ClNa et l'on procède comme précédemment.

Les mesures de diffusion de la lumière et de viscosité sont faites dans les conditions précisées aux chapitres 4 et 5.

RESULTATS EXPERIMENTAUX -

L'ensemble de ceux-ci ont conduit à définir trois domaines de forces ioniques. Le premier correcpond aux forces ioniques supérieures à 0,2 M, le second aux forces ioniques comprises entre 0,2 et 0,05 M et le troisième aux forces ioniques inférieures à 0,05 M.

- Premier domaine -

Les forces ioniques ont varié de 0,2 à 0,55 M. La concentration du lysozyme dans tous les mélanges était de 600 µg / cm3 et celle de l'ADN a varié de 15 à 120 µg / cm3.

La fonction de diffusivité de l'ADN contenu dans ces mélanges est calculée en considérant le solvant comme constitué par la solution saline de lysozyme. Cette fonction de diffusivité ainsi calculée est celle de l'ADN dans les mêmes conditions de concentration et de force ionique en absence de lysozyme.

-- Deuxième domaine -

L'expérimentation a été conduite sur des mélanges de forces ioniques 0,1 et 0,05 M. Les mélanges à 600 µg / cm3 de lysozyme, même à faible concentration d'ADN, contiennent des agrégats macroscopiques dont on ne peut se débarrasser que par une longue centrifugation (5 heures à 30.000 g) .

Nos essais nous ont conduits à adopter le mode opératoire suivant ; nous avons réalisé des mélanges à concentration d'ADN constante (60 µg / cm3 ) et à différentes concentrations de lysozyme (de 10 à 800 µg / cm3 ) .

En dessous d'une concentration de lysozyme $C_o$ , elle-même fonction de la force ionique et de la concentration en ADN, la fonction de diffusivité de l'ADN calculée comme précédemment est la même que celle de l'ADN en absence de lysozyme dans les mêmes conditions de concentration et de force ionique.

En étudiant les mélanges de concentration en lysozyme légèrement supérieure à $C_o$ , nous avons obtenu des résultats relatifs aux premiers stades des associations ADN-lysozymes.

Pour une force ionique de 0,1 M, la concentration $C_o$ du lysozyme est inférieure à 80 µg / cm3. Pour des concentrations de lysozyme égales ou supérieures à 80 µg / cm3 le coefficient de diffusivité à angle nul augmente considérablement ainsi que le rayon de giration moyen (figure 1 VI) .

Pour une force ionique de 0,05 M, $C_o$ est inférieur à 10 µg / cm3. Pour des concentrations de lysozyme égales ou supérieures à $C_o$ , le coefficient de diffusivité à angle nul augmente rapidement avec la concentration en lysozyme, mais le rayon de giration commence par diminuer pour croître ensuite.

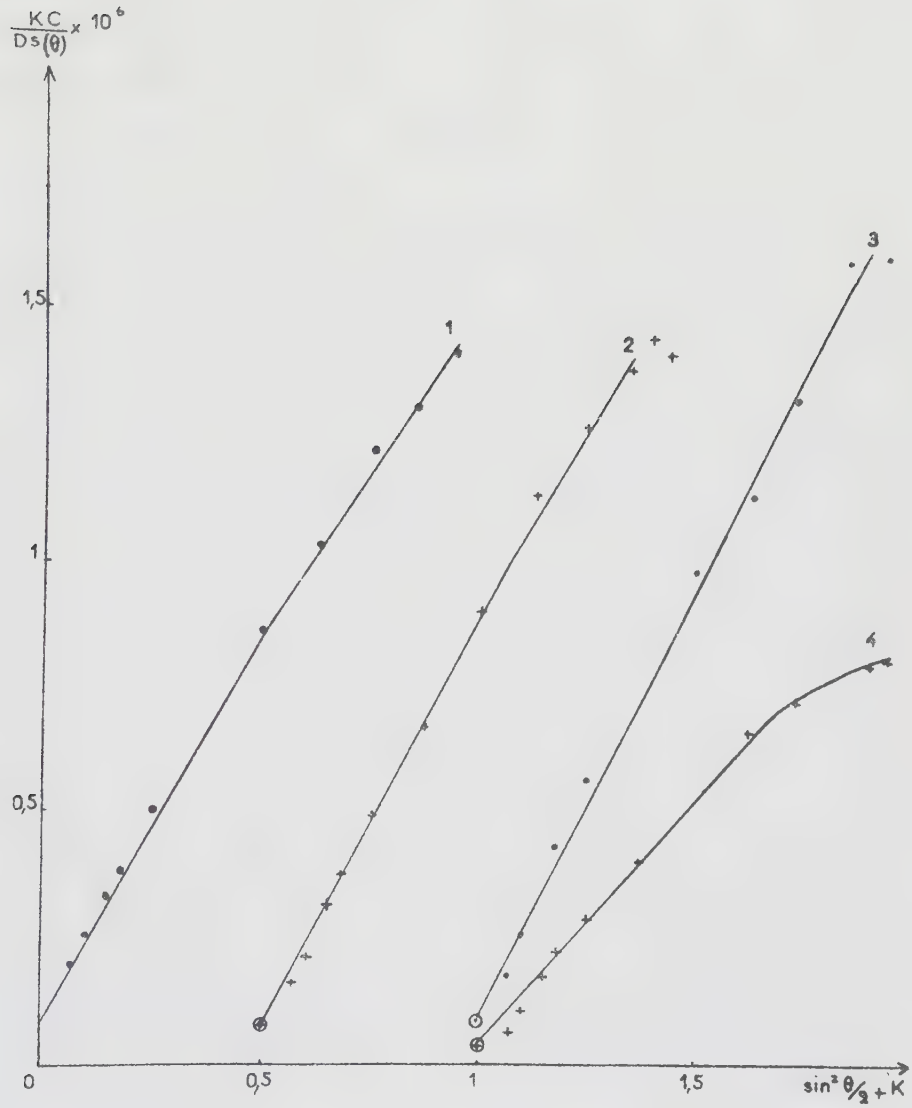



Figure 1 VI

Diagramme de diffusion des mélanges ADN-lysozyme à pH 8,5 et à force ionique 0,1 M. La constante K du terme $\sin^2\theta/2 + K$ est entièrement indépendante de celle du terme $KC/D_s\theta$ ; elle est introduite uniquement pour présenter clairement sur la même figure les diagrammes relatifs aux quatre solutions suivantes :

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1- ADN | 60 µg / cm3 | | | K = 0 |
| 2- ADN | 60 µg / cm3 | - Lysozyme | 20 µg cm3 | K = 0,5 |
| 3- ADN | 60 µg / cm3 | - Lysozyme | 40 µg cm3 | K = 1 |
| 4- ADN | 60 µg cm3 | - Lysozyme | 80 µg cm3 | K = 1 |

En amenant la concentration du lysozyme à 20 µg / cm3, le coefficient de diffusivité du mélange est à peu près doublé, tandis que le rayon de giration est diminué de près de la moitié. Pour une concentration de lysozyme de 40 µg /cm3 le coefficient de diffusivité est très fortement augmenté et le rayon de giration est légèrement plus grand que celui correspondant au mélange précédent à 20 µg/cm3.

Des déterminations de viscosité et de biréfringence d'écoulement ont été effectuées sur les mélanges de grand coefficient de diffusivité et, fait inattendu, aucune différence n'a été trouvée entre ces mélanges et ceux correspondant à l'ADN seul dans les mêmes conditions de concentration et de force ionique.

Avec un mélange contenant 40 µg /cm3 de lysozyme, il a été possible d'obtenir un précipité au bout de plusieurs jours en très faibles quantités ; l'analyse de ce précipité a révélé qu'il contenait de l'ADN et du lysozyme dans un rapport de 1 à 4.

Nous avons résumé sur le tableau 2 VI les résultats expérimentaux obtenus pour les forces ioniques 0,1 et 0,05 M.

- Troisième domaine -

Ce domaine est celui des forces ioniques inférieures à 0,05 M. Il est caractérisé par le fait que l'addition de très faibles quantités de lysozyme provoque la formation d'un précipité. L'étude de ce domaine est limitée par l'instabilité de l'ADN aux forces ioniques inférieures à 0,001 M à la température de 20°C . Nous allons décrire, à titre d'exemple, le comportement correspondant à la force ionique de $10^{-3}$ M.

La concentration en ADN étant constante (33 µg /cm3) les concentrations en lysozyme ont varié de 10 à 40 µg / cm3. Après centrifugation (5 h à 30.000 g) les surnageants sont analysés.

Le coefficient de diffusivité de ces mélanges est d'autant plus élevé que la concentration de lysozyme est plus grande, mais le rayon de giration reste inchangé comme on le voit sur la figure 2 VI.

Les viscosités réduites ont été déterminées sur les solutions ayant servi aux mesures de diffusion de la lumière. Nous avons rassemblé, dans le tableau 3 VI, les coefficients de diffusivité, les rayons de giration et la viscosité réduite.

- T A B L E A U 2 VI -

| | Mélanges ADN $\mu g/cm^3$ - Lys. $\mu g/cm^3$ | $10^4 (D_s)_{\theta = 0}$ | $R_G$ (Å) | P.M. apparent de l'ADN | $\eta_{red.}$ C.G.S |
|---|---|---|---|---|---|
| $\mu$ = 0,1 M | 60 - 0 | 1,52 | 2 400 | $10^7$ | |
| | 60 - 20 | 1,52 | 2 400 | $10^7$ | |
| | 60 - 40 | 1,52 | 2 400 | $10^7$ | |
| | 60 - 80 | 3,04 | 2 400 | $2.10^7$ | |
| | 60 - 800 | | | | |
| $\mu$ = 0,05 M | 60 - 0 | 1,52 | 2 400 | $10^7$ | 10 800 |
| | 60 - 10 | 1,98 | 1 900 | $1.3.10^7$ | 10 800 |
| | 60 - 20 | 2,90 | 1 220 | $1.9.10^7$ | 10 800 |
| | 60 - 40 | 17,5 | 1 930 | $11.5.10^7$ | 10 800 |
| | 60 - 160 | | | | |

Les coefficients de diffusivité mesurés sur les dillutions de ces mélanges sont pproportionnels aux concentrations de ceux-ci. Il s'ensuit que l'extrapolation à concentration nuelle n'est pas nécessaire dans ce sens.

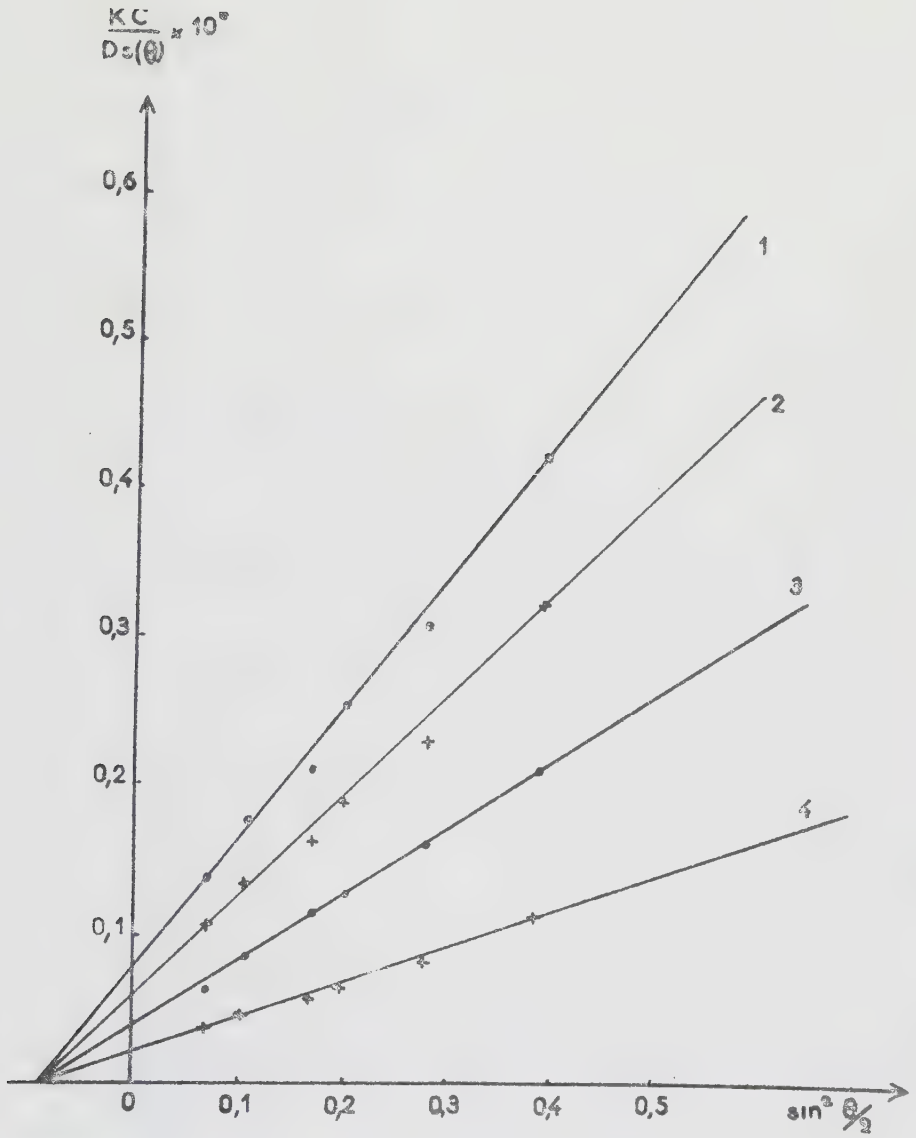



Figure 2 VI

Diagramme de diffusion des solutions ADN-lysozyme à force ionique 0,01 M après centrifugation 5 heures à 30.000 g correspondant aux mélanges initiaux suivants :

1- ADN 33 µg/cm3
2- ADN 33 µg/cm3 - lysozyme 10 µg/cm3
3- ADN 33 µg/cm3 - lysozyme 20 µg/cm3
4- ADN 33 µg/cm3 - lysozyme 40 µg/cm3

- TABLEAU 3 VI -

| Mélanges initiaux ADN µg/cm3 Lys µg/cm3 | Mélanges après centrifugation à $3.10^4$ g ADN µg/cm3 . Lys µg/cm3 | $10^4$ $[\Delta s^{(\ell)}]_{\phi = 0}$ | $R_G$ (Å | P.M. $10^{-6}$ | $\eta_{red}$ C.G.S. |
|---|---|---|---|---|---|
| 33 - 0 | 33 - 0 | 1,97 | 1.800 | 13 | 11.000 |
| 33 - 10 | 33 - 0 | 2,73 | 1.800 | 18 | 10.900 |
| 33 - 20 | 31 - 0 | 4,1 | 1.800 | 27 | 10.700 |
| 33 - 40 | 29 - 0 | 7,1 | 1.800 | 47 | 10.500 |

En outre, nous avons fait des tentatives d'études aux forces ioniques inférieures à $10^{-3}$ M. Pour cela, de l'ADN a été électrodialysé à 4° C. Au cours de cette opération, la conductivité de la solution diminue progressivement, jusqu'à devenir équivalente à celle de ClNa $10^{-5}$ M, puis en poursuivant l'électrodialyse, elle augmente rapidement. Devant cette instabilité de l'ADN aux très faibles forces ioniques, nous nous sommes contentés d'étudier directement les propriétés d'un complexe ADN-lysozyme. Nous avons préparé ce complexe par mélange d'une solution d'ADN et de lysozyme en proportions telles que les concentrations finales soient de 100 µg/cm3 pour l'ADN et de 500 µg/cm3 pour le lysozyme en présence de ClNa $10^{-3}$. Les deux constituants précipitent totalement (après centrifugation, le surnageant n'absorbe pratiquement plus à 260 et 280 mµ).

Le précipité maintenu en suspension par agitation est électrodialysé à 4° C. Au bout de 24 heures on centrifuge, la résistivité du surnageant est alors de $0,8.10^{6}\ \Omega$ cm, valeur correspondant à la résistance de l'eau permutée utilisée à la préparation des solutions. On analyse le surnageant et l'on trouve qu'il contient un mélange ADN - lysozyme , dans le rapport de 1 à 5. La masse moléculaire moyenne de ce complexe déterminée par diffusion de la lumière est de $160.10^{6}$ environ.

## = Discussion des Résultats =

Pour chacun des trois domaines de forces ioniques que nous avons distingués au cours de l'étude précédente nous donnons les conclusions auxquelles aboutit l'analyse des résultats expérimentaux.

Premier domaine - $0,2 \leqslant \mu \leqslant 0,55$

Les conclusions sont évidentes ; à la précision des expériences, on ne peut pas déceler d'association entre l'ADN et le lysozyme.

Deuxième domaine - $0,05 \leqslant \mu \leqslant 0,2$

Puisque l'accroissement de diffusivité des mélanges à partir d'une concentration-seuil en lysozyme n'entraîne aucune modification dans les mesures de biréfringence d'écoulement et de viscosité, on est amené à penser que les particules responsables de la modification de diffusivité n'ont qu'une contribution négligeable à la viscosité et à la biréfringence, peut-être à cause de la

symétrie sphérique de leur forme et de leur importance pondérale très réduite. La concentration des molécules d'ADN non engagées dans ces particules n'est donc pas sensiblement modifiée. Ces particules ont un poids moléculaire très supérieur à celui de l'ADN seul et les rayons de giration observés sur les mélanges, suivant qu'ils sont plus grands ou plus petits que ceux de l'ADN, indiquent que les rayons de giration des particules du complexe formé sont eux-mêmes plus grands ou plus petits que ceux des molécules d'ADN. Le fait important de la discussion de ces résultats est l'hétérogénéité de l'ADN. En effet, nous avons vu que le précipité n'intéressait qu'une faible partie des molécules d'ADN et qu'il contenait 4 fois plus de lysozyme que d'ADN. Le fait que les molécules de lysozyme viennent se concentrer sur certaines molécules d'ADN plutôt que de se répartir uniformément sur l'ensemble des molécules suggère une certaine hétérogénéité des molécules d'ADN vis-à-vis de leur interaction avec le lysozyme dans ces conditions de concentration, de pH et de force ionique. Ceci n'exclut évidemment pas la possibilité d'autres causes de la sélectivité de l'association (par exemple, un effet coopératif dans la fixation des molécules de lysozyme sur l'ADN).

Troisième domaine $\mu < 0,05$ M

Ce qu'il y a de remarquable dans ce domaine, c'est l'absence de lysozyme, à la sensibilité des dosages près, dans le surnageant après centrifugation des mélanges pendant plusieurs heures à 30.000 g, bien que le coefficient de diffusivité du surnageant ait augmenté et que le rayon de giration moyen des particules soit constant et égal à celui de l'ADN témoin. Aussi pour nous rendre compte de la raison de l'accroissement du coefficient de diffusivité, nous avons soumis le surnageant à des centrifugations de l'ordre de 80.000 g. Dans le second surnageant ainsi obtenu, l'ADN a le même poids moléculaire et le même rayon de giration que l'ADN initial (figure 3 VI). Il en résulte que la partie responsable de l'augmentation de diffusivité dans le premier surnageant est de l'ADN agrégé par des traces de lysozyme et, comme le rayon de giration de ces particules est le même que celui des particules de l'ADN témoin, il est vraisemblable que l'agrégation entre les particules d'ADN est une agrégation latérale des chaînes dont sont constituées ces particules, ceci pourrait conduire à des molécules comportant 2 n chaînes comme cela a été mis en évidence sur certaines préparations par CAVALIERI et coll. (15). En outre, puisque le lysozyme préci-

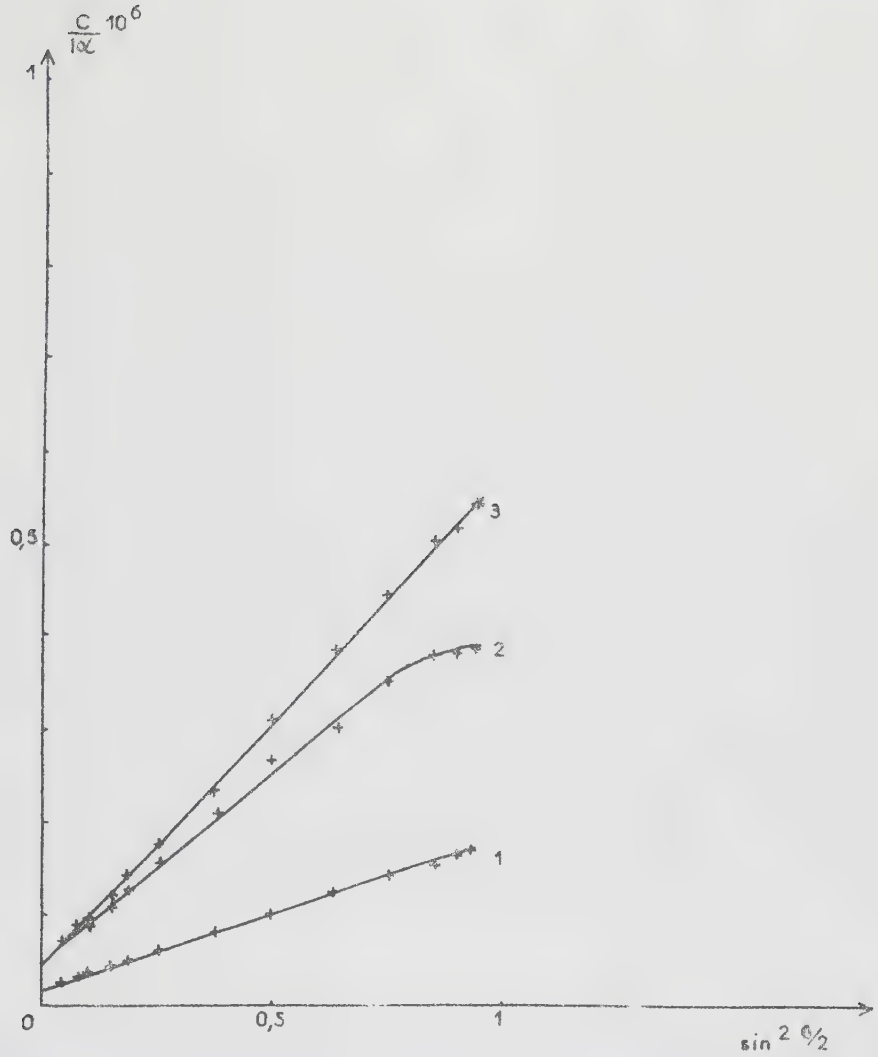



Figure 3 VI

Diagramme de diffusion des mélanges ADN-lysozyme à force ionique 0,01 M correspondant aux mélanges initiaux suivants :

1- ADN 33 µg / ml - Lysozyme 45 µg/ml après centrifugation 5 h. à 30.000 g

2- ADN 33 µg/ml - Lysozyme 40 µg/ml après centrifugation 2 h. à 80.000 g

3- ADN 33 µg/ml " " 5 h. à 30.000 g

pite quantitativement avec de l'ADN et qu'il n'y a pas répartition de lysozyme de façon uniforme sur toutes les molécules d'ADN, il faut se représenter la fixation du lysozyme comme étant très rapide si bien qu'au moment du mélange de la solution d'ADN à celle du lysozyme, cette dernière s'épuise en lysozyme avec les premières molécules d'ADN rencontrées pour donner un précipité très peu dissociable, composé d'une partie d'ADN pour dix parties de lysozyme. Dans ces conditions de concentration des constituants, de force ionique et de pH des solutions, aucune hétérogénéïté n'apparaît entre les diverses molécules d'ADN vis-à-vis de leur interaction avec le lysozyme car ces interactions sont très fortes. Ceci explique aussi que les moindres traces de lysozyme fixées sur les molécules d'ADN se trouvant au voisinage des zones de précipitation, lors de la préparation des mélanges, sont responsables de l'agrégation de ces molécules d'ADN. Un phénomène analogue a été remarqué par SADRON (82) sur des solutions de certains échantillons d'ADN de différentes forces ioniques ; les poids moléculaires de l'ADN mesurés sur ces solutions sont plus élevés pour les solutions de faibles forces ioniques (dans certains cas, de 3 fois) que pour celles de fortes forces ioniques. On peut penser qu'il reste dans ces préparations d'ADN de faibles quantités de protéines qui agrègent les molécules d'ADN aux faibles forces ioniques. Ces protéines agiraient de la même façon que le lysozyme.

## CONCLUSION -

Cette étude permet de mettre en évidence , à pH constant, trois domaines de forces ioniques dans lesquelles le jeu des forces d'interaction conduit à des résultats différents : domaine de fixation intégrale, domaine de fixation partielle, domaine de non fixation. L'hétérogénéïté des molécules d'ADN en ce qui concerne leurs propriétés d'interaction avec le lysozyme est admise pour expliquer les modalités de l'association dans le second domaine. Les modalités d'association dans le troisième domaine mettent en jeu à la fois des conditions de neutralisation électrostatique de charges portées par les molécules d'ADN et de lysozyme, et des conditions de diffusion des deux réactifs au moment du mélange.

# T R O I S I E M E  P A R T I E

## ETUDE ENZYMOLOGIQUE INDIRECTE DES COMPLEXES NUCLEIQUES

Au cours de cette troisième partie, après avoir rappelé les notions essentielles concernant la dégradation enzymatique de l'ADN par la DNase I, nous étudierons de façon théorique et expérimentale les conditions d'utilisation de la viscosimétrie pour mesurer la dégradation enzymatique de l'ADN. Il nous sera alors possible d'entreprendre l'étude de la dégradation enzymatique de l'ADN complexé à deux colorants, la quinacrine et le vert de méthyle. Après avoir précisé les données théoriques sur lesquelles repose cette étude, nous verrons quelles sont les informations que l'on peut retirer d'une telle étude, information sur la structure primaire de l'ADN (séquence des bases) informations sur les modalités de la complexation.

# CHAPITRE VII

## GENERALITES SUR LA DEGRADATION ENZYMATIQUE DE L'ADN

Les désoxyribonucléases, qui sont par définition les enzymes capables d'hydrolyser les acides désoxyribonucléiques, peuvent être considérées comme un sous-groupe des phosphodiestérases. Les DNases sont classées en deux groupes ; celles qui hydrolysent les liaisons phosphodiester de la chaîne polynucléotidique en libérant des fonctions monoester 5' phosphate sont dites DNases I alors que celles qui libèrent des fonctions monoester 3' phosphate sont dites DNases II. Ce critère de classification coïncide d'ailleurs avec un autre qui fait intervenir le pH optimal d'action et la spécificité des ions activateurs.

| | | | |
|---|---|---|---|
| DNase I | pH optimal | voisin de 7, $Mg^{++}$ | indispensable |
| DNase II | pH optimal | voisin de 5, $Mg^{++}$ | non indispensable. |

On retrouve ces deux sortes d'enzyme dans les organismes vivants. Nous n'envisagerons ici que la DNase I de KUNITZ extraite du pancréas de boeuf.

### LA DNase de KUNITZ -

Extraite et cristallisée pour la première fois par KUNITZ (54), cette enzyme est une protéine dont le poids moléculaire a été trouvé par KUNITZ (54) égal à 60.000 et par POLSON (72) égal à 40.000. Son point isoélectrique est voisin de 5. Elle se classe parmi les DNases I. Nous n'envisagerons ici cette enzyme que sous deux aspects, la spécificité et le mode d'action.

#### Spécificité

Comme nous l'avons déjà signalé la DNase libère des fonctions monoester 5' phosphate. De ce point de vue, la spécificité est absolue. En ce qui concerne cette spécificité, un autre problème peut être posé. Existe-t-il sur la chaîne polynucléotidique de l'ADN des liaisons préférentiellement attaquées ?
Ce problème est éclairé par trois types d'expérience ;

- l'analyse des produits de la réaction
- l'étude de la cinétique d'action de la DNase sur les acides apuriniques et apyrimidiques.
- l'étude de la cinétique d'action de la DNase sur les polynucléotides de synthèse dont les séquences en bases peuvent être dans certaines conditions contrôlées.

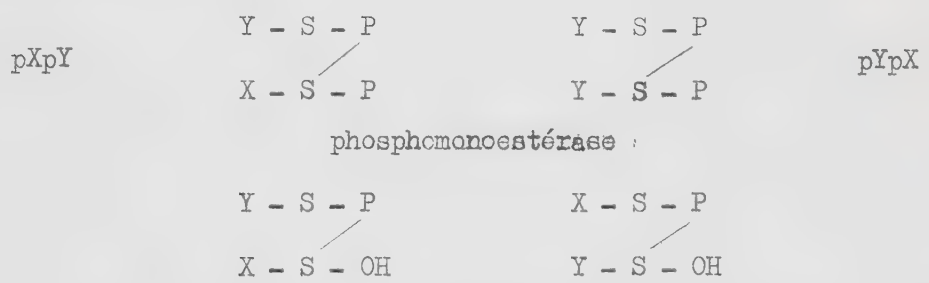
a) Analyse des produits de la réaction ADN - DNase

L'électrotitration montre qu'après hydrolyse exhaustive, - KUNITZ (55) LITTLE et BUTLER (62) - il y a environ 25% de liaisons hydrolysées. Il se forme 1% de mononucléotides et 17% de dinucléotides. L'analyse de ces dinucléotides a été effectuée par SINSHEIMER (89) (90). Après séparation par chromatographie des dinucléotides des produits de la réaction ADN - DNase, ces dinucléotides sont analysés du point de vue de leur isomèrie. Comme nous l'avons signalé lors de l'étude de la structure de l'ADN, la chaîne polynucléotidique est orientée. Un dinucléotide peut donc exister sous deux formes isomères que l'on peut écrire avec les conventions d'écriture :

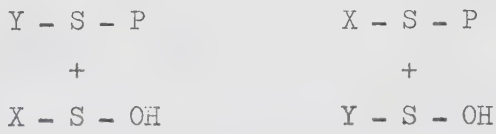
pXpY et pYpX

X et Y représentant des nucléosides quelconques.

Si ces dinucléotides sont traités par une phosphomonoestérase, on a :

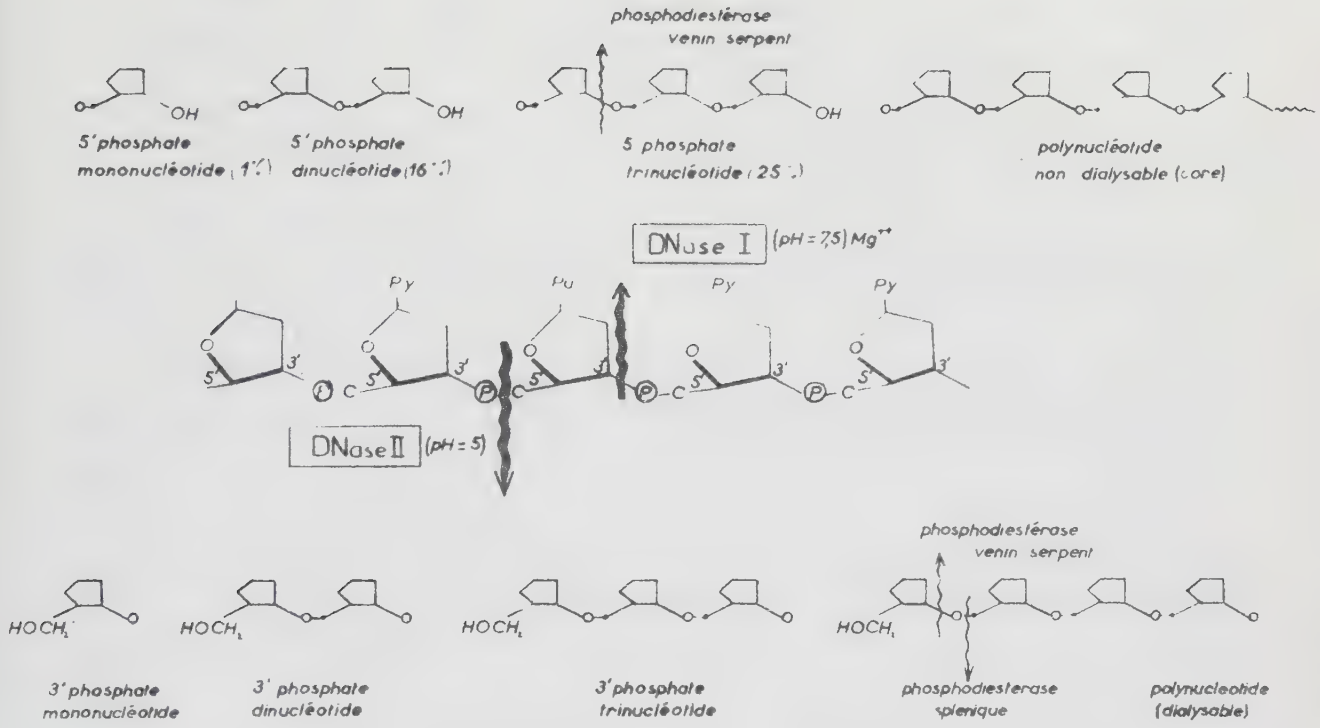



Les produits de la réaction sont isolés sur échangeur d'ions et traités par une phosphodiestérase. On obtient :




Les mononucléotides sont alors séparés sur échangeur d'ions. L'analyse quantitative de chaque fraction permet de déterminer les proportions de chacun des isomères. En effet au nucléotide Y - S - P correspond pXpY et au nucléotide X - S - P correspond pYpX. Les fractions de chacun des isomères sont égales aux fractions de chacun des nucléotides Y - S - P et X - S - P.

Par cette méthode, on trouve dans les produits de la réaction une proportion bien plus élevée d'isomère pPupPy que d'isomère pPypPu à l'exception du dinucléotide pGpC. On est donc conduit à admettre que la séquence pPupPy à




MODE D'ACTION DES DESOXYRIBONUCLEASES

Figure 1 VII

l'exception de la séquence pGpC a été préférentiellement attaquée par la DNase. Des résultats et des conclusions identiques ont été apportés par PRIVAT DE GARILHE (75).

D'autre part le trinucléotide ApApTp isolé d'un hydrolysat ADN-DNase II est hydrolysé par la DNase I de KUNITZ en ApAp et Tp - POTTER et coll. (73) -

b) Cinétique d'action de la DNase sur les acides apuriniques et apyrimidiques.

TAMM, SHAPIRO et CHARGAFF (99) ont montré que le détachement des bases puriques (chauffage en milieu acide) de la chaîne polynucléotidique bloquait l'action de la DNase.

TAKEMURA (98) a montré que le détachement des bases pyrimidiques par hydrazynolyse réduit très fortement la susceptibilité de l'ADN à l'action de la DNase I.

Ces études montrent donc que la présence simultanée des deux sortes de base est nécessaire pour l'action de la DNase, ce qui est tout à fait en accord avec les résultats précédents.

c) Cinétique d'action sur les polynucléotides de synthèse

RALPH et coll. (77) ont étudié l'action de la DNase I sur les oligonucléotides synthétiques polypuriques et polypyrimidiques ( $(Pup)_n$ et $(Pyp)_n$). Les résultats obtenus peuvent être résumés ainsi :

- La concentration en enzyme doit être plus élevée pour obtenir l'hydrolyse. L'affinité de l'enzyme pour les liaisons Pu-Pu et Py-Py est donc plus faible que pour les liaisons et/ou Pu-Py Py-Pu.

- Les polynucléotides puriques sont attaqués plus vite que les polynucléotides pyrimidiques et $(Ap)_n$ est attaqué plus rapidement que $(Tp)_n$ qui est lui-même attaqué plus rapidement que $(Cp)_n$.

- L'affinité de l'enzyme pour ces oligonucléotides augmente avec la longueur de la chaîne, c'est-à-dire avec n.

Ces résultats ne sont pas en contradiction avec les précédents, ils les renforcent même en montrant que l'affinité de l'enzyme pour les liaisons Pu-Pu et Py-Py est très faible. Les études de ces auteurs, actuellement en cours, sur

la cinétique de dégradation des oligonucléotides contenant à la fois les liaisons Pu-Pu, Py-Py, Pu-Py et Py-Pu éclaireront certainement ce problème de façon plus quantitative.

En conclusion, on peut admettre, à la lumière de ces faits, que la spécificité de la DNase pour les liaisons Pu-Py est certaine, et qu'elle n'est sans doute que préférentielle sans qu'on puisse quantifier cette préférence. De plus cette spécificité peut sans doute évoluer au cours de la réaction. Dans sa phase initiale, lorsque le nombre de liaisons coupées est faible devant le nombre de liaisons totales, il est probable que l'affinité supérieure de l'enzyme pour les liaisons Pu-Py fait qu'elles sont en premier attaquées. En phase terminale, lorsque beaucoup de ces liaisons ont été hydrolysées, l'enzyme deviendrait peut être capable d'attaquer les autres liaisons. Cette possibilité est toutefois limitée puisque la réaction s'arrête lorsque 25% des liaisons ont été hydrolysées.

De plus, on ne sait rien sur l'effet de la structure secondaire sur cette spécificité. On sait seulement que la vitesse de réaction diminue lorsque l'ADN a été dénaturé par la chaleur - KURNICK (56). Ce problème est donc loin d'être compris dans sa totalité.

Mode d'action de la DNase de KUNITZ

L'étude de la réaction ADN - DNase I, et donc du mode d'action de l'enzyme, est compliquée par le fait qu'il n'existe pas de techniques très précises d'étude de ce système. Toutefois, les nombreuses études physico-chimiques faites ont abouti aux conclusions que nous allons résumer brièvement.

En premier, il faut se rappeler que la molécule d'ADN est constituée de deux chaînes polynucléotidiques reliées entre elles par des liaisons hydrogène. Seules les liaisons phosphodiesters de la chaîne nucléotidique sont directement attaquées par l'enzyme. Pour qu'il y ait coupure de la molécule, il faudra donc qu'il apparaisse deux liaisons hydrolysées sur les deux chaînes adjacentes en deux points opposés.

A la lumière des études faites, le film de l'attaque de la molécule d'ADN par l'enzyme peut être résumé ainsi :

Tout d'abord, on observe une période de latence pendant laquelle aucune modification physico-chimique importante ne peut être décelée. Pendant cette pé-

riode, le nombre des liaisons phosphodiester hydrolysées n'est pas suffisant pour qu'il y ait eu coupure de la molécule (il n'y a pas de liaisons coupées en opposition sur les deux chaînes adjacentes). Il est toutefois très important de constater que les études faites sur l'ADN doué de pouvoir transformant par ZAMENHOF et coll. (109) montrent que c'est au cours de cette période que l'activité biologique de la molécule disparaît.

L'étape suivante se caractérise par l'apparition de doubles coupures. La viscosité des solutions, le poids moléculaire, la biréfrigence d'écoulement, la constante de sédimentation baissent alors rapidement. Pendant cette période la molécule est dégradée sans qu'il y ait dénaturation. La structure secondaire est conservée et le nombre de liaisons hydrogène rompues est négligeable.

La troisième étape est caractérisée par la dénaturation des produits d'hydrolyse. C'est lors de cette étape que, par suite de la rupture des liaisons hydrogène, l'effet hyperchromique se manifeste, c'est à dire que l'absorption de la lumière ultraviolette par les solutions augmente. C'est également pendant cette période que l'affinité de l'ADN pour certains colorants (vert de méthyle) diminue.

La dernière étape de la réaction est caractérisée par l'apparition d'éléments si petits qu'il sont dialysables et qu'ils ne sont plus précipitables par les acides forts. Puis 25% des liaisons hydrolysables ayant été attaquées, la réaction s'arrête.

L'étude physico-chimique de la réaction (étude de la décroissance de la viscosité intrinsèque et du poids moléculaire de la molécule en fonction du nombre de liaisons hydrolysées) a conduit certains auteurs à proposer un modèle permettant de représenter les modalités d'action de la DNase. Nous rappellerons et discuterons celui proposé par THOMAS (100).

## Modèle de THOMAS

L'auteur suppose que toutes les liaisons sont également susceptibles d'être attaquées par l'enzyme, ce qui signifie que la probabilité de coupure d'une liaison à un instant donné de la réaction est la même pour toutes les liaisons.

Par suite de la structure de la molécule d'ADN en double chaîne, pour qu'il y ait scission de la molécule, il est nécessaire que deux coupures soient situées exactement l'une en face de l'autre sur les deux chaînes adjacentes. Si $p$ est la probabilité de coupure d'une liaison phosphodiester à un instant donné, la probabilité de coupure de la molécule sera ;

$$s = p^2$$

Il est alors possible de trouver une relation entre le nombre de double coupure $\gamma$ et le poids moléculaire. Si $u_z$ est le degré de polymérisation pondéré en z, le nombre de simple coupure est ;

$$2\ pu_z$$

et $$\gamma = pu_z = p^2 u_z$$

On a alors $$M(p)/M = 1/(1 + \gamma/3)$$

M étant le poids moléculaire initial et $M(p)$ le poids moléculaire après $\gamma$ coupures.

En fait, la décroissance du poids moléculaire mesurée expérimentalement est plus rapide que ne le laisse prévoir ce modèle. L'auteur montre toutefois qu'il est possible de rendre compte des résultats expérimentaux à l'aide de ce modèle si l'on multiplie le nombre de double coupure par un facteur $(2\ h + 1)$ ou $h = 2$. Il interprète ce résultat en admettant que la coupure de la molécule se produit également lorsque deux simples coupures sur les deux chaînes adjacentes sont séparées par 2 ou moins de deux nucléotides (figure 2 VII). Ce modèle rend compte des résultats expérimentaux mais ne tient pas compte de la spécificité de l'enzyme, et au moins une hypothèse de départ (égale probabilité de coupure de toutes les liaisons) est certainement incorrecte.

Nous allons maintenant montrer comment on peut tout aussi bien rendre compte des résultats expérimentaux en admettant la spécificité de l'enzyme qui, comme nous l'avons vu, repose sur des faits difficilement contestables.

Dans le modèle que nous proposons, seules certaines liaisons sont hydrolysables dans la molécule. Ces liaisons sont déterminées par la spécificité de l'enzyme. En première approximation, nous admettons que ces liaisons hydrolysables (Pu-Py principalement ont la même affinité pour l'enzyme. De plus, par suite de la polarité opposée des deux chaînes, ces liaisons se trouvent situées exacte-

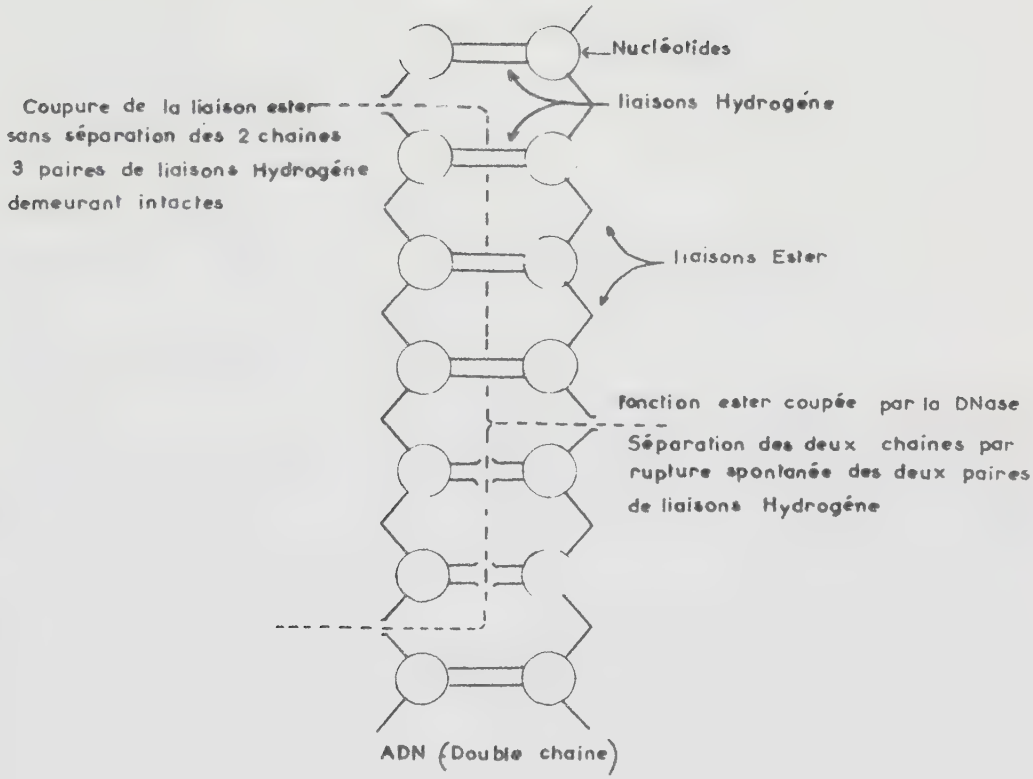



Figure 2 VII

Diagramme schématique de la dégradation de l'ADN par la DNase I d'après THOMAS.

ment l'une en face de l'autre (figure 3 VII) . Si p est la probabilité de coupure d'une de ces liaisons, la probabilité de coupure de la molécule sera donc exactement :

$$s = p^2$$

Soit 1/n la proportion dans la molécule des liaisons susceptibles d'être attaquées par l'enzyme. Dans notre modèle, la probabilité de coupure d'une liaison est n fois plus grande que dans le modèle de THOMAS puisqu'il y a n fois moins de liaisons hydrolysables, et le degré de polymérisation rapporté au nombre de liaisons hydrolysables est donc ;

$$u_3 / n$$

Pour THOMAS on avait ;

$$\gamma = p^2 u_3 (2h + 1) \qquad \text{avec } h = 2$$

Avec notre modèle

$$\gamma = p^2 u_3 n$$

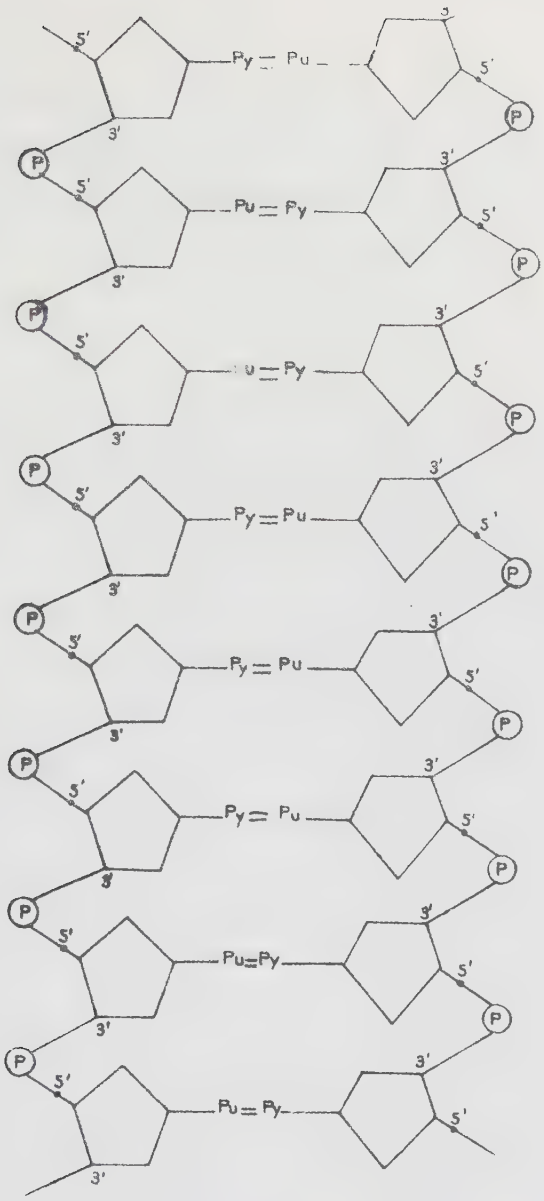
L'étude de la spécificité de la DNase et de la séquence des bases dans la molécule d'ADN montre que n n'est pas significativement différent du facteur (2 h + 1) introduit par THOMAS.

En effet, lors de l'étude de la réaction ADN - DNase nous avons rappelé que seulement 25 % des liaisons étaient susceptibles d'être attaquées. Ce chiffre correspondrait à une valeur de 4 pour n. D'autre part, les liaisons préférentiellement attaquées sont toutes les liaisons PupPy à l'exception de GpC. Or, à partir des résultats de l'analyse des séquences des bases de l'ADN par la méthode du plus proche voisin (Chapitre III) on peut calculer pour l'ADN de thymus de veau ;

$$(Pu\text{-}Py) - (G - C) = 18{,}1\ \%, \text{ soit } n = 5{,}5$$

On voit donc à la lumière de ces faits que n est très voisin de 5, valeur que THOMAS attribuait au facteur (2 h + 1) . Il est donc tout à fait possible d'interpréter les résultats expérimentaux concernant l'étude physico-chimique de la réaction en faisant intervenir la spécificité de la DNase qu'on peut difficilement mettre en doute.

Au cours du prochain chapitre, nous rapporterons et discuterons le modèle d'APPLEQUIST (2) de caractère plus général pouvant représenter le modèle que nous venons de proposer et qui a servi de base aux calculs que nous avons effectués pour déterminer à partir des données viscosimétriques le nombre de liaisons coupées dans la molécule d'ADN.




ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE

Figure 3 VII

Sur cette figure on remarquera qu'étant donné la polarité opposée des deux chaînes, chaque fois que l'on a un enchaînement Pu-Py sur une chaîne, cet enchaînement se retrouve sur la chaîne adjacente exactement en opposition.

# CHAPITRE VIII

# ETUDE THEORIQUE ET EXPERIMENTALE DES CONDITIONS D' UTILISATION DE LA VISCOSIMETRIE POUR LA DETERMINATION DES ACTIVITES DESOXYRIBONUCLEASIQUES

-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-

## INTRODUCTION -

Pour suivre l'action dépolymérisante de la désoxyribonucléase (DNase) sur l'acide désoxyribonucléique (ADN), de nombreux auteurs avaient déjà utilisé la mesure de la décroissance de la viscosité des solutions d'ADN, mais ils s'étaient heurtés principalement à deux difficultés. Une difficulté d'ordre théorique : la relation quantitative entre le nombre de liaisons hydrolysées et la chute de la viscosité n'ayant pas été établie, aucune évaluation rigoureuse de la vitesse de la réaction enzymatique ne pouvait donc être faite. Une difficulté d'ordre instrumental : les mesures effectuées le plus souvent à l'aide de tubes capillaires étaient faites à des vitesses de cisaillement très élevées dans un domaine de concentration où l'écoulement des solutions est particulièrement non newtonien. De plus, la viscosité des solutions diminuant au cours de la réaction d'hydrolyse de l'ADN, la vitesse de cisaillement à laquelle étaient effectuées les mesures augmentait donc au cours de la réaction. SCHUMAKER (83) avait déjà signalé l'importance de ce fait en montrant que la décroissance apparente de la viscosité spécifique au cours du temps dépendait de la vitesse de cisaillement à laquelle étaient effectuées les mesures et donc des caractéristiques des capillaires utilisés. Tout ceci amenait à adapter avec plus de précision cette méthode à l'étude de la dégradation enzymatique de l'ADN. Par ailleurs, la sensibilité de cette méthode (un petit nombre de coupures de liaisons phosphodiester entraînant une chute importante de la viscosité) est très appréciable si ces difficultés sont surmontées.

Dans ce travail, nous présenterons une méthode viscosimétrique permettant l'évaluation d'une grandeur proportionnelle à la vitesse vraie de la réaction enzymatique. Puis nous discuterons la valeur de cette méthode à la lumière des résultats expérimentaux.

ETUDE THEORIQUE -

Une unité d'activité enzymatique est définie (*) comme "la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat pendant l'unité de temps. Quand plus d'une liaison est mise en jeu, c'est la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'un micro-équivalent du groupe concerné".

Dans le cas de l'ADN, on peut donc définir une unité d'activité comme la quantité d'enzyme qui catalyse l'hydrolyse d'une liaison phosphodiester pendant l'unité de temps. La détermination de la vitesse de la réaction enzymatique v qui est ici le nombre de liaisons hydrolysées pendant l'unité de temps et qui est proportionnelle à la quantité d'enzyme permettra donc de déterminer l'activité DNasique. Or, en viscosimétrie, les grandeurs mesurables ne sont pas directement liées à v. Il faut donc en premier, établir la relation entre la chute de la viscosité des solutions d'ADN sous l'effet de la DNase et le nombre de liaisons phosphodiester rompues dans la molécule. L'établissement de cette relation fait appel au modèle d'APPLEQUIST (2) . Dans ce modèle un polymère est constitué de deux chaînes reliées entre elles et formant une chaîne double, unique et linéaire, de paires de résidus. Le nombre de résidus est considéré comme très grand. Un résidu est relié à un résidu voisin de la même chaîne par une liaison dite liaison P et à un résidu adjacent sur la chaîne opposée par une liaison dite liaison H. Dans ce modèle, la double chaîne est dégradée par coupure des liaisons P qui se produisent de façon aléatoire. Une molécule est considérée comme groupe de résidus reliés entre eux par des liaisons P et H. L'extrémité d'une molécule apparaîtra chaque fois que les deux chaînes auront été coupées entre deux liaisons H successives. La distribution des poids moléculaires est caractérisée par la fraction p des liaisons P rompues. p est également la probabilité de coupure d'une liaison P. La probabilité pour que l'extrémité d'une molécule apparaisse p' ou la probabilité de coupure de la double chaîne est donc :

$$p' = p^2 \qquad (1 \text{ VIII})$$

---

(*) Définition de la Commission des Enzymes de l'Union internationale de Biochimie. (101)

Si $P_w$ est le nombre moyen pondéré en poids de paires de résidus par molécule ou degré de polymérisation, on a :

$$P_w = 2/p^2 \quad (2 \text{ VIII})$$

Si

$n_t$ est le nombre de liaisons coupées au temps $t$

$n_o$ " " " " " $0$

$u$ " " " avant qu'aucune coupure ne soit intervenue

on a $p = n_t/u$ (3 VIII) $p_o = n_o / u$ (4 VIII)

où $p_o$ est la valeur de $p$ au temps 0.

Si les liaisons sont rompues selon une réaction d'ordre 1, on a :

$$(u - n_t) = (u - n_o)\, e^{-kt} \quad (5 \text{ VIII})$$

où $k$ est la constante de vitesse de la réaction pour les coupures des liaisons P.

On a donc :

$$I - p = (I - p_o)\, e^{-kt} \quad (6 \text{ VIII})$$

Quand $kt \ll 1$, c'est-à-dire au début de la réaction, on a :

$$e^{-kt} = 1 - kt \quad (7 \text{ VIII})$$

ce qui conduit en éliminant $p$ entre les équations 2 et 6 VIII

$$(P_{wo}/P_w)^{1/2} = (M_o/M)^{1/2} = I + \frac{I - p_o}{p_o}\, kt \quad (8 \text{ VIII})$$

où $P_{wo}$ est la valeur de $P_w$ à $t = 0$ et $M_o$ et $M$ les masses moléculaires aux temps 0 et t.

Dans le cas particulier de la dégradation de l'ADN par la DNase, la réaction peut être considérée, tout au moins au début de la réaction, comme étant d'ordre nul, on a alors :

$$p = p_o + kt \quad (9 \text{ VIII}) \text{ ou } n_t = n_o + ukt \quad (10 \text{ VIII})$$

$$\text{et } (M_o/M)^{1/2} = 1 + kt/p_o \quad (11 \text{ VIII})$$

Par définition, la vitesse de la réaction enzymatique est:

$$-dn_t/dt = v = uk \quad (12 \text{ VIII})$$

En admettant que la viscosité intrinsèque $(\eta)$ des molécules d'ADN est proportionnelle à leur masse moléculaire M au cours de la dégradation enzymatique comme l'a montré THOMAS (100) :

$$(\eta) = K' M \quad (13 \text{ VIII})$$

On est conduit à la relation :

$$\left[ (\eta_o / (\eta) \right]^{1/2} = 1 + kt / p_o = 1 + jt \qquad (14 \text{ VIII})$$

où $(\eta)_o$ est la valeur de $(\eta)$ à $t = 0$

en posant $k / p_o = j$ (15 VIII)

et $$\frac{(\eta)}{(\eta)_o} = \frac{1}{(1 + jt)^2} \qquad (16 \text{ VIII})$$

D'autre part, on admet que la relation d'HUGGINS entre la viscosité spécifique, la viscosité intrinsèque et la concentration c :

$$\eta_{sp} = A \, (\eta)^2 \, c^2 + (\eta) \, c \qquad (17 \text{ VIII})$$

reste valable pour le système en évolution, A étant indépendant de c.

En éliminant $(\eta)$ entre les équations 17 et 16 VIII on tire :

$$\eta_{sp} = \frac{A \, (\eta)_o^2 \, c^2 + (\eta)_o \, c(1 + jt)^2}{(1 + jt)^4}$$

pour $jt \ll 1$ on peut négliger dans le développement de $1/(1 + jt)^n$ les termes de degré supérieur, et :

$$\eta_{sp} = n_{spo} - 2 \, jtc\left(2 \, A \, (\eta)_o^2 \, c + (\eta)_o\right) \qquad (19 \text{ VIII})$$

$\eta_{sp}$ et $\eta_{spo}$ étant respectivement les viscosités spécifiques aux temps 0 et t.

La relation 19 VIII représente l'équation de la tangente à l'origine de la courbe représentative $\eta_{sp} = f(t)$

Sa pente K est :

$$K = -2jc \left(2A \, (\eta)_o^2 \, c + (\eta)_o\right) \qquad (20 \text{ VIII})$$

$$-j = \frac{K}{2c \left(2A \, (\eta)_o^2 \, c + (\eta)_o\right)} \qquad (21 \text{ VIII})$$

Il est alors possible d'exprimer v puisque :

$$v = uk = ujp_o$$

Si R est le poids moléculaire d'un résidu, on a $M = 2 \, P_w R$ (22 VIII)

et $u = c/R \, . \, N$ (23 VIII)

N, nombre d'Avogadro.

De plus,

$$p = \frac{\sqrt{2}}{\sqrt{P_w}} \qquad (24\ \text{VIII})$$

$$P_w = \frac{M}{2\,R}$$

$$p = 2\sqrt{R}/\sqrt{M} = 2\sqrt{R}/\sqrt{K'\,(\eta)} \qquad (25\ \text{VIII})$$

On a donc :

$$-v = \frac{K}{(2A\ (\eta)_o^2\ c + (\eta)_o)} \cdot \frac{1}{\sqrt{M_o}} \cdot \frac{N}{\sqrt{R}} \qquad (26\ \text{VIII})$$

Les grandeurs telles que

$$V_1 = \frac{K}{2\,A\,(\eta)_o^2\ c + (\eta)_o} \times \frac{1}{\sqrt{M_o}} \qquad (27\ \text{VIII})$$

$$V_2 = \frac{K}{2\,A\,(\eta)_o^2 + (\eta)_o} \times \frac{1}{\sqrt{(\eta)_o}} \qquad (28\ \text{VIII})$$

qui ne diffèrent de v que par un facteur constant, auront donc bien théoriquement les caractéristiques d'une vitesse d'action enzymatique. La détermination de la pente à l'origine de la courbe représentative $\eta_{sp} = f\,(t)$ permet donc dans ces conditions de calculer, à une constante près, les vitesses d'action DNasiques. Connaissant K, il est possible de calculer j et donc de calculer, à l'aide de l'expression 18 VIII, tous les points de la courbe $\eta_{sp} = f\,(t)$.

- Cas particulier -

Quelques auteurs et en particulier CONWAY et BUTLER (14) ont trouvé pour certains échantillons d'ADN et pour des concentrations salines exprimées en ClNa voisines de 0,1 M que le coefficient A était nul et donc qu'il n'y avait aucune dépendance de la viscosité réduite avec la concentration. Dans ce cas, on a :

$$\eta_{red} = \eta_{sp}/c = (\eta) \qquad (29\ \text{VIII})$$

L'expression 19 VIII devient :

$$\eta_{sp} = \eta_{sp_o} - 2\ jtc\ (\eta)_o \qquad (30\ VIII)$$

et

$$V_1 = \frac{K}{(\eta)_o} \frac{1}{\sqrt{M_o}} \qquad (31\ VIII)$$

Pour une même vitesse de réaction, K sera donc plus petit et l'expression viscosimétrique de la vitesse ne sera pas, dans ce cas, influencée par la concentration (expression 31 VIII).

## ETUDE EXPERIMENTALE -

Tout au long de ce calcul, nous avons supposé que la valeur de A restait bien constante au cours de la réaction. Dans notre étude expérimentale, nous déterminerons dans quelles conditions ceci est réalisé. Cette étude comportera donc deux parties :

a - Détermination de A au cours de la réaction

b - Application de ce calcul à la mesure d'une vitesse d'action enzymatique.

Nous montrerons alors que v tel que nous l'avons calculé a bien le comportement expérimental d'une vitesse d'action enzymatique telle qu'elle est caractérisée dans la théorie de HENRI-MICHAELIS. Nous serons donc amenés à étudier successivement l'effet de la concentration enzymatique, l'effet de la concentration en substrat, c'est-à-dire en ADN, et l'effet des caractéristiques physico-chimiques de l'ADN utilisé.

### - Matériel -

1- ADN :

Préparés au laboratoire à partir de thymus de veau par diverses méthodes afin d'obtenir des propriétés physico-chimiques différentes. Les méthodes employées sont celles utilisant les détergents de KAY et Coll. (49), la papaïne (AUBIN et coll., 5), le phénol (KIRBY, 51). Les poids moléculaires sont mesurés par diffusion de la lumière. Le tableau I VIII rassemble les caractéristiques des ADN employés.

Tableau I VIII

CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES DE DIFFERENTS ECHANTILLONS D'A D N UTILISES

| A D N | V 69 | V 63 | V 72 | V 97 | V 49 | V 49 bis | IP |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Méthode de préparation | Papaïne | Détergent | Détergent | Papaïne | Phénol | Détergent | Détergent |
| P.... | $5,2\ 10^6$ | $8\ 10^6$ | $6,2\ 10^6$ | $6,5\ 10^6$ | $9\ 10^6$ | $5,5\ 10^6$ | $10,8\ 10^6$ |
| Rayon de Giration | 2 500 | 2 800 | 2 700 | 2 600 | 2 900 | 2 500 | 2 100 |
| A | 1,25 | 0,56 | 0,87 | | 1,03 | 1,23 | 0,60 |
| (η /o | 3 200 | 5 300 | 4 500 | | 5 200 | 2 200 | 3 200 |
| E(P) | 6 700 | 6 600 | 6 500 | 6 900 | 6 500 | 7 000 | |
| Protéines | 0,3 % | 0,3 % | 0,4 % | 0,3 % | 0,5 % | 0,3 % | |

2- Désoxyribonucléase

L'enzyme utilisée, de marque WORTHINGTON, est une préparation pure de désoxyribonucléase I cristallisée trois fois extraite du pancréas de boeuf.

- M é t h o d e s -

a- Réaction d'hydrolyse de l'ADN -

La réaction ADN DNase est conduite à pH 7,5 en milieu tampon tris- HCl 0,066 M, $Cl_2Mg$ 0,025 M, ClNa 0,14 M.

b- Mesure de la viscosité -

Les mesures sont effectuées à 25° C avec un appareil LECONTE du NOUY (63) du type "COUETTE". La vitesse de cisaillement est égale à 15 $sec^{-1}$. Il est possible, en laissant l'hydrolyse de l'ADN par la DNase se poursuivre directement dans la cellule, de suivre de façon continue la décroissance de la viscosité au cours de la réaction.

c- Mesure de A et $(\eta)$ pour des systèmes en évolution -

La droite $\eta_{red} = f(c)$ a pour pente $(\eta^2)A$, elle coupe l'axe des ordonnées au point $(\eta)$. En divisant la pente de cette droite par $(\eta)^2$, on obtient A.

On fait agir la DNase sur une solution d'ADN. Aussitôt après l'addition de la DNase, on prélève 2 ml de milieu réactionnel que l'on recueille sur 0,5 ml de citrate de sodium 0,33 M. Cette opération est répétée toutes les minutes. L'action de la DNase se trouvant bloquée par le citrate, il est possible de déterminer la viscosité spécifique de la solution d'ADN à des temps précis au cours de la réaction enzymatique.

Chacune des solutions citratées correspondant aux différents temps d'évolution de la réaction est diluée plusieurs fois et la viscosité spécifique de chacune de ces dilutions est déterminée. Il est possible alors de tracer les courbes $\eta_{sp}/c = f(c)$ correspondant aux différents temps d'évolution de la réaction et par là, de calculer les valeurs correspondantes de A et $(\eta)$.

RESULTATS EXPERIMENTAUX -

1 - Variations de A et $(\eta)$

Les déterminations de A et $(\eta)$ ont été conduites sur trois échantillons d'ADN différents (IP , $V_{49}$ , $V_{49}$bis ) dont les viscosités intrinsèques sont

respectivement de 3200, 5200 et 2200 u CGS ). Sur le tableau 2 VIII, nous avons rassemblé les résultats concernant les variations de A , $(\eta)$ et $[(\eta)_o/(\eta)]^{1/2}$ au cours de la réaction. Sur les figures 1 et 2 VIII nous avons représenté, pour une expérience type, la fonction $[(\eta)_o/(\eta)]^{1/2} = f(t)$ et les fonctions $\eta_{red} = f(c)$ pour divers temps de la réaction.

On peut remarquer sur le tableau 2 VIII que pour les ADN dont la viscosité intrinsèque est élevée (IP et $V_{49}$ ) au début de la réaction A reste constant, mais que lorsque la viscosité intrinsèque s'abaisse aux environs de 2000, A décroît très rapidement. Lorsque la viscosité intrinsèque de l'ADN est peu élevée ($V_{49}$bis) A décroît dès le début de la réaction. A est donc d'autant plus longtemps constant au cours de la réaction que la viscosité intrinsèque de l'ADN initial est plus élevée.

On peut voir, de plus, sur la figure 1 VIII que la variation de $[(\eta)_o/(\eta)]^{1/2}$ en fonction du temps, est bien linéaire et donc du type prévu par les considérations théoriques précédentes. De plus, sur le tableau 2 VIII, on peut voir que la densité optique (D.O.) à 250 mμ mesurée sur la solution d'ADN au cours de la réaction ne varie pas pendant la période étudiée et que, par conséquent, il n'y a, pendant cette période, pas ou peu de liaisons hydrogène rompues dans la molécule d'ADN.

2 - Variations de $\eta_{sp}$ avec le temps

Après une période de latence qui dépend de la concentration enzymatique et des caractéristiques physico-chimiques de l'ADN utilisé et dont nous discuterons plus loin la signification, la viscosité spécifique décroît linéairement puis au bout d'un certain temps (figure 3 VIII) la courbe $\eta_{sp} = f(t)$ s'incurve progressivement, sa pente diminuant. Ce comportement est donc tout à fait en accord avec les considérations théoriques précédentes. En particulier, la portion linéaire de cette courbe est d'autant plus longue et mieux définie que la vitesse de la réaction enzymatique est plus petite.

3 - Effet de la concentration en enzyme

Les courbes $\eta_{sp} = f(t)$ sont établies à partir de solutions d'égales concentrations d'un même échantillon d'ADN ($V_{97}$) en présence de différentes

TABLEAU 2 VIII

VARIATIONS DE A, $(\eta)$ et $\left[(\eta)_o/(\eta)\right]^{1/2}$ au COURS DE LA REACTION ADN DNase
(concentration en DNase 0,09 µg/ ml)

| Temps | ADN $V_{49}$ bis (C = 0,400 mg / ml) | | | ADN $V_{49}$ (C = 0,490 mg / ml) | | | ADN IP | | | D. O. (C=0,031 mg/ml) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| minutes | A | $(\eta)$ | $\left[(\eta)_o/(\eta)\right]^{1/2}$ | A | $(\eta)$ | $\left[(\eta)_o/(\eta)\right]^{1/2}$ | A | $(\eta)$ | $\left[(\eta)_o/(\eta)\right]^{1/2}$ | à 260 mµ |
| 1/2 | 1,23 | 2200 | 1 | 1,03 | 5200 | 1 | 0,595 | 3200 | 1 | 0,650 |
| 1 | - | - | - | 0,95 | 4700 | 1,05 | - | - | - | 0,650 |
| 2 | 1,13 | 2100 | 1,02 | 1 | 4000 | 1,14 | 0,59 | 2900 | 1,05 | 0,670 |
| 3 | 0,92 | 2000 | 1,05 | 0,96 | 3500 | 1,22 | 0,63 | 2700 | 1,09 | 0,640 |
| 4 | 0,84 | 1900 | 1,07 | 1 | 3200 | 1,28 | 0,59 | 2600 | 1,11 | 0,630 |
| 5 | 0,68 | 1800 | 1,11 | 0,9 | 3000 | 1,31 | 0,61 | 2500 | 1,13 | 0,650 |
| 6 | 0,65 | 1750 | 1,12 | 0,9 | 2800 | 1,36 | 0,63 | 2350 | 1,16 | 0,640 |
| 7 | 0,6 | 1650 | 1,16 | 0,9 | 2600 | 1,41 | 0,6 | 2250 | 1,19 | 0,630 |
| 8 | 0,6 | 1500 | 1,21 | 0,81 | 2500 | 1,44 | 0,52 | 2150 | 1,22 | 0,650 |
| 10 | 0,5 | 1380 | 1,27 | 0,95 | 2200 | 1,53 | 0,48 | 2060 | 1,245 | 0,630 |
| 15 | 0,25 | 1050 | 1,46 | 0,22 | 2100 | 1,61 | 0,24 | 1600 | 1,42 | 0,650 |
| 20 | | | | ≃ 0 | 1800 | 1,7 | ≃ 0 | 1400 | 1,52 | 0,680 |

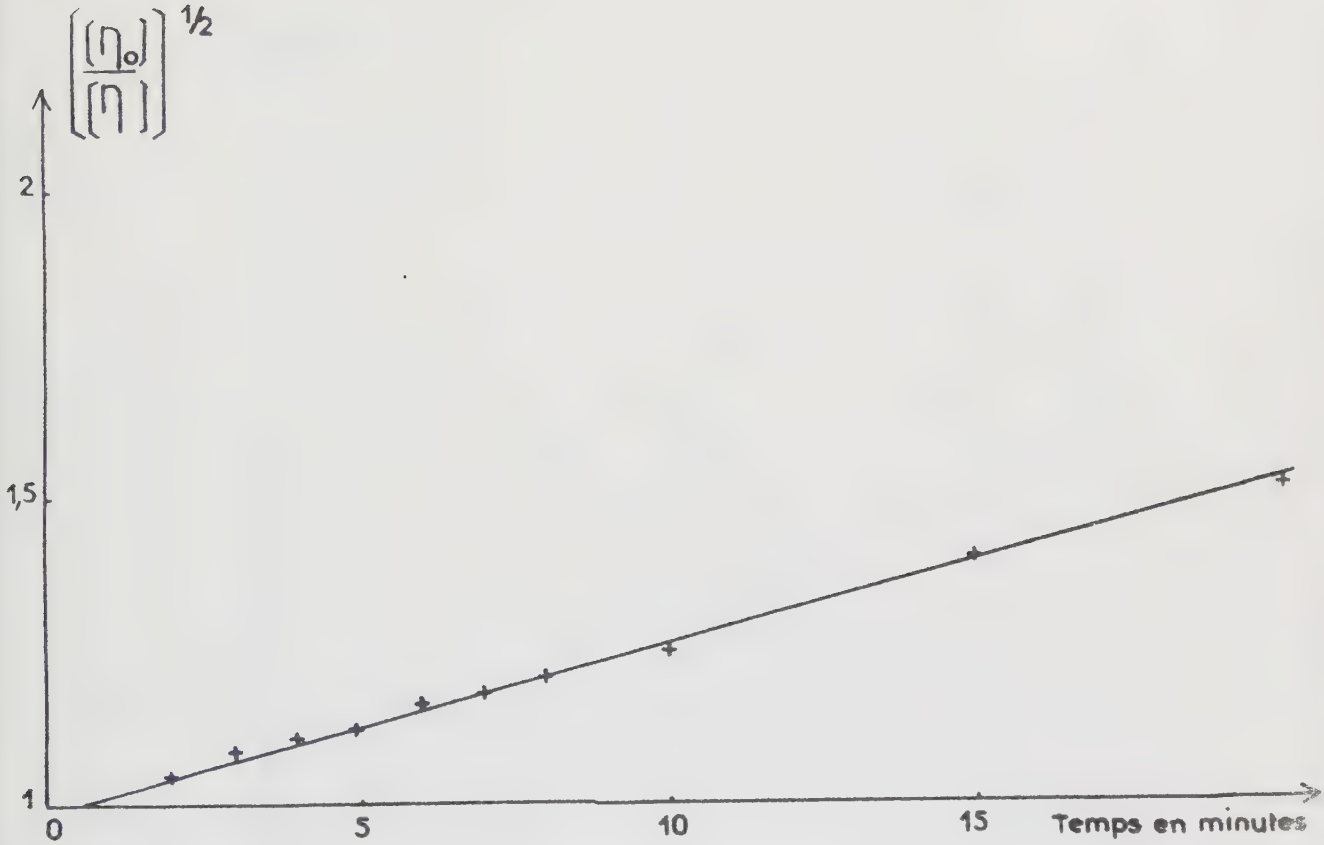



Figure 1 VIII

Représentation graphique de la fonction $\left[(\eta_0)/(\eta)\right]^{1/2} = f(t)$.

(Résultats expérimentaux correspondant à l'ADN IP, du tableau 2 VIII)

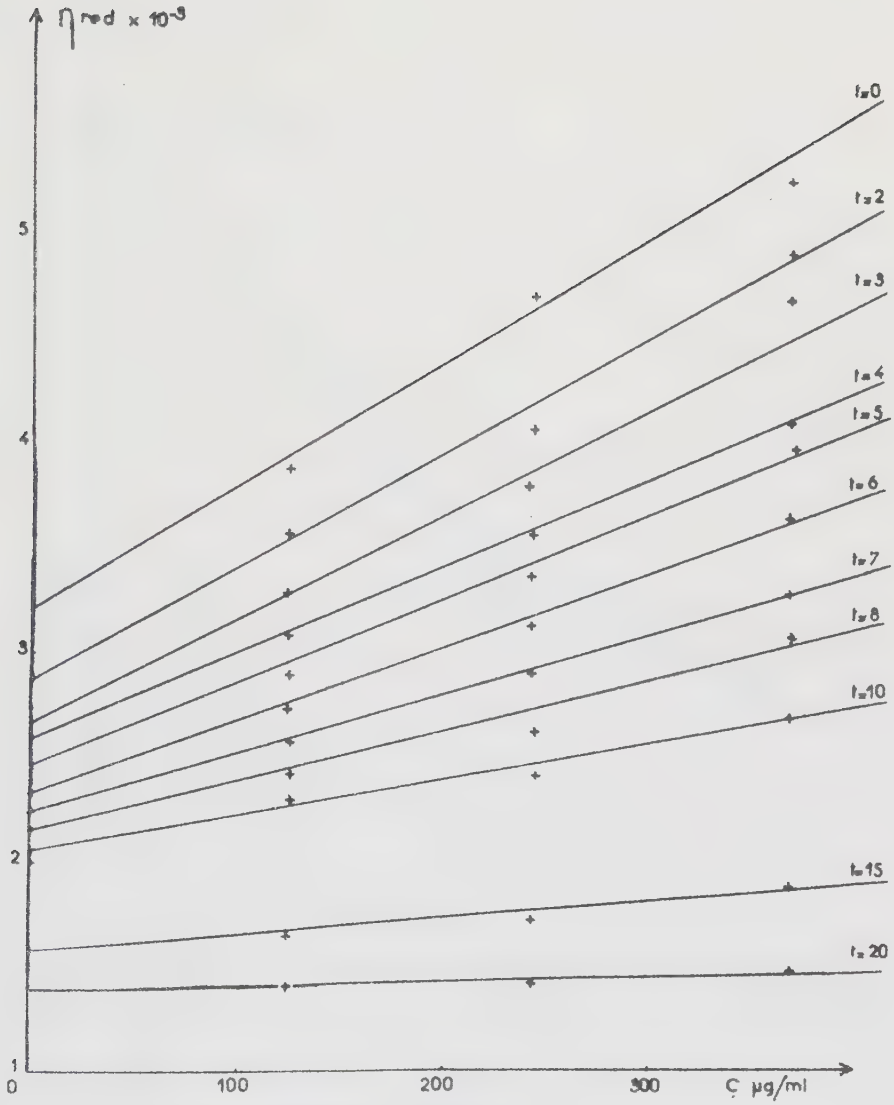



Figure 2 VIII

Représentation graphique de l'évolution de la fonction $\eta_{red} = f(c)$, au cours de la réaction ADN-DNase.

(Résultats expérimentaux correspondant à l'ADN IP du tableau 2 VIII.

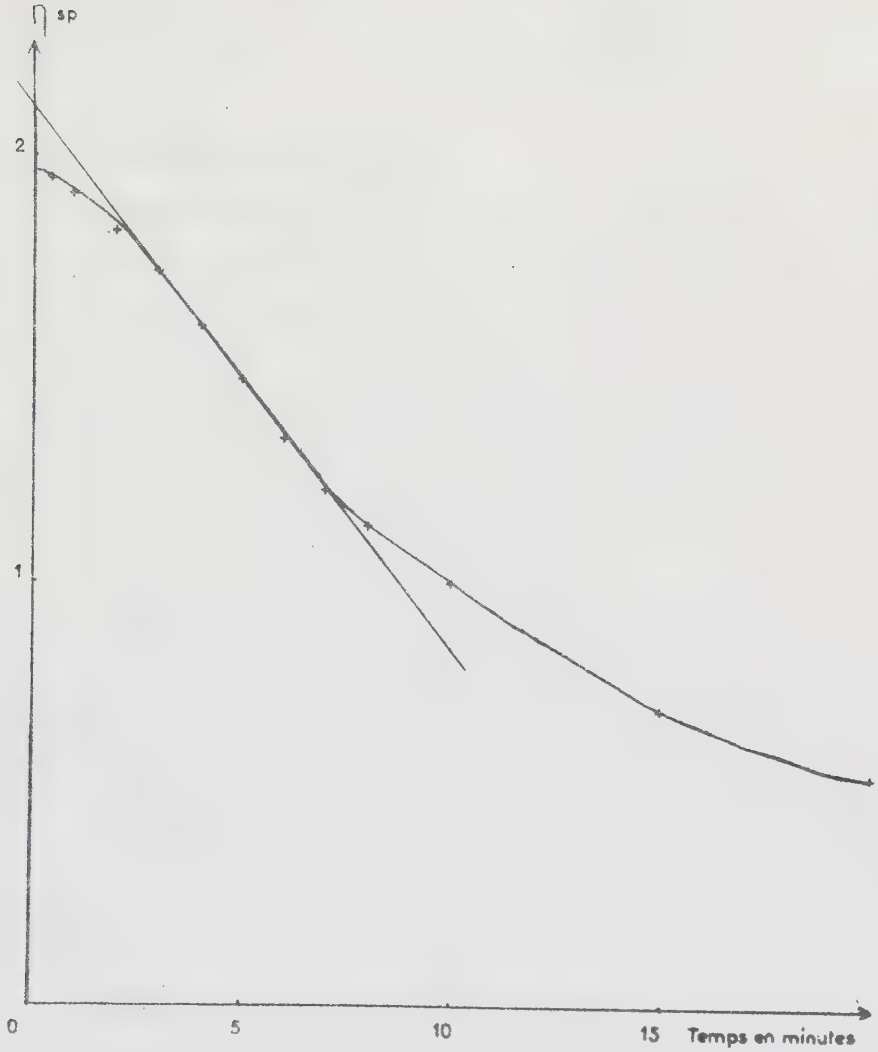



Figure 3 VIII

Représentation graphique de la fonction $\eta_{sp} = f(t$ .

(Résultats expérimentaux correspondant à l'ADN IP du tableau 2 VIII

quantités d'enzyme. Les conditions expérimentales exactes et les résultats sont résumés sur la figure 4 VIII et le tableau 3 VIII. On peut voir que le rapport $K/e$ ($e$ étant la concentration enzymatique) est constant, autrement dit que $K$ est proportionnel à $e$ et que si $v$ est déterminé selon l'une des expressions 27 ou 28 VIII, $v$ est bien proportionnel à $e$.

4 - Effet de la concentration en ADN

Si $v$ tel que l'on peut l'exprimer par l'une ou l'autre des expressions 27 ou 28 VIII a bien les caractéristiques d'une vitesse enzymatique, $I/v$ doit varier linéairement avec $I/c$ comme le veulent les lois de la cinétique enzymatique. Nous avons donc mesuré $K$, et calculé $v$ à l'aide de l'une de ces expressions, en effectuant des mesures avec différentes concentrations d'ADN. L'échantillon d'ADN est le même tout au long d'une même expérience alors que la concentration en enzyme reste constante. La figure 5 VIII montre que dans ces conditions $I/v$ varie bien linéairement avec $I/c$.

5 - Effet des propriétés physico-chimiques de l'ADN utilisé

L'expression 27 ou 28 VIII nous montre que $K$ doit dépendre des propriétés physico-chimiques de l'ADN et en particulier des valeurs de $A$, $(\eta)_o$ et $M_o$. Nous avons donc mesuré $K$ en utilisant des concentrations enzymatiques identiques et des échantillons d'ADN ayant des propriétés physico-chimiques différentes. Les solutions sur lesquelles sont effectuées les mesures ont des concentrations en ADN très voisines.

Sur le tableau 4 VIII $v$ est exprimé à partir d' l'expression 28 VIII. Les vitesses, mesurées à des concentrations en ADN légèrement différentes, ont été corrigées en les ramenant à une même valeur de la concentration. Nous avons admis dans ce cas que la vitesse de la réaction enzymatique était dans ce domaine proportionnelle à la concentration du substrat.

Sur le tableau 5 VIII $v$ est exprimé au moyen de 27 VIII et pour différentes concentrations. Dans tous les cas, des variations importantes de $A$ $(\eta)_o$ et $M_o$ entraînant pour une même concentration enzymatique, des différences notables des valeurs de $K$ (jusqu'à 10 fois) et n'affectent $v$ que d'une manière que l'on peut considérer comme peu sensible et à la limite des erreurs près.

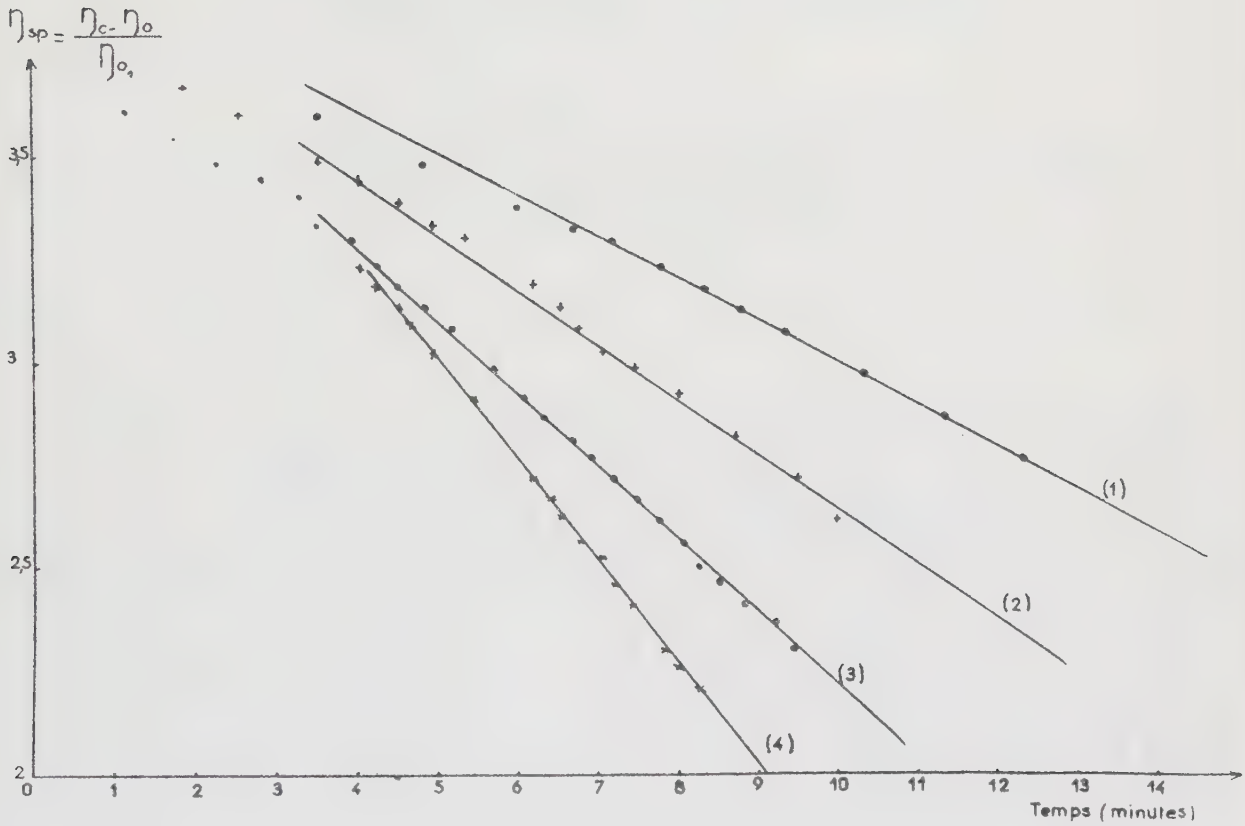



Figure 4 VIII

Effet de la concentration en DNase sur la vitesse de décroissance de la viscosité spécifique.

Le numéro des courbes correspond à ceux du tableau 3 VIII.

# T A B L E A U 3 VIII

## EFFET DE LA CONCENTRATION EN DNase SUR LA VITESSE DE DECROISSANCE DE LA VISCOSITE SPECIFIQUE

Ces résultats sont représentés graphiquement sur la fig.4 VIII. Les mesures ont été effectuées avec l'ADN $V_{97}$ La concentration était : 0,330 mg/ml.

| | Concentration (e) en DNase ($\mu$g/ml) | K Chute de $\eta_{sp}$/min | K/e |
|---|---|---|---|
| I | 0,133 | 0,10 | 0,75 |
| 2 | 0,166 | 0,12 | 0,72 |
| 3 | 0,250 | 0,18 | 0,72 |
| 4 | 0,333 | 0,25 | 0,75 |

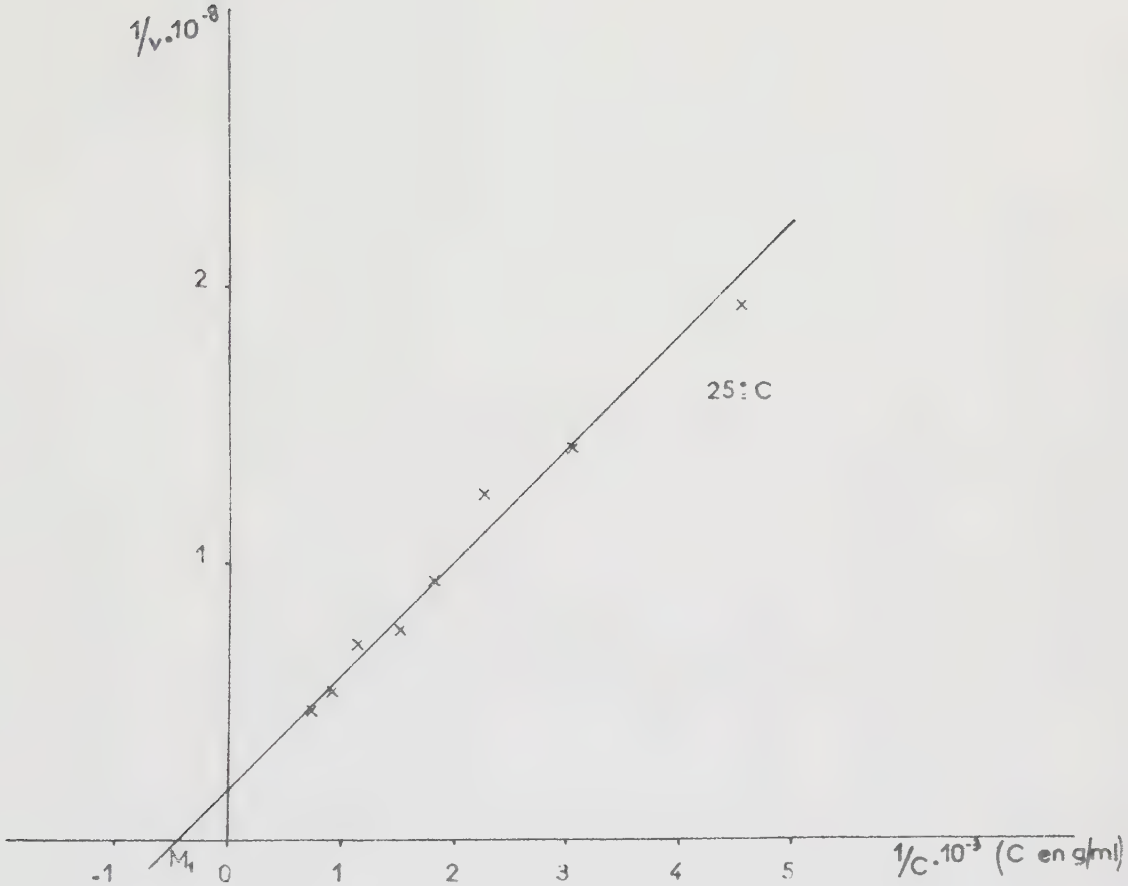



Figure 5 VIII

Représentation des variations de I/v = f(I/c).

La concentration en DNase est de 0,09 µg/ml, l'échantillon d'ADN utilisé est $V_{72}$. Pour le calcul de $V_I$(27 toutes les valeurs sont exprimées dans le système CGS à l'exception de K qui est la chute de viscosité spécifique par minute.

Tableau 4 VIII

MESURES DE V ($V_2$) AVEC DES ECHANTILLONS D'ADN DIFFERANT PAR LEURS PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

(La concentration en DNase est de 0,09 µg/ml)

| A D N | $V_{49}$bis | $V_{72}$ | $V_{49}$ | $V_{80}$ | IP |
|---|---|---|---|---|---|
| $(\eta)$ | 2200 | 4500 | 5200 | 8800 | 3200 |
| A | 1,23 | 0,87 | 1,03 | 0,26 | 0,60 |
| $A\,(\eta)_o^2$ | $5{,}95\ 10^6$ | $17{,}6\ 10^6$ | $28\ 10^6$ | $20\ 10^6$ | $610^6$ |
| ADN, C µg/ml | 400 | 435 | 490 | 370 | 460 |
| K (chute de $\eta_{sp}$/min) | 0,11 | 0,40 | 1,2 | 0,54 | 0,12 |
| $2A(\eta)_o^2\ C + (\eta)_o$ | 6950 | 19800 | 32600 | 23500 | 8700 |
| $\sqrt{(\eta)_o}$ | 47 | 67 | 72 | 94 | 56,5 |
| $V_2$ (28) corrigé et rapporté à C = 460 µg/ml | $039\ 10^{-6}$ | $0{,}32\ 10^{-6}$ | $0{,}47\ 10^{-6}$ | $0{,}30\ 10^{-6}$ | $0{,}25\ 10^{-6}$ |

TABLEAU 5 VIII

MESURE DE V ($V_1$) AVEC DES ECHANTILLONS D'ADN DIFFERANT PAR LEURS PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES (CONCENTRATION EN DNase 0,09 µg/ml)

| ADN | | $V_{63}$ | $V_{69}$ |
|---|---|---|---|
| | C mg/ml | 0,120 | 0,120 |
| K | chute de $\eta_{sp}$ par minute | 0,069 | 0,042 |
| | $V_1$ (27) | $2,7\ 10^{-9}$ | $2,9\ 10^{-9}$ |
| | C mg/ml | 0,150 | 0,160 |
| | K | 0,09 | 0,057 |
| | $V_1$ (27) | $3,30\ 10^{-9}$ | $3,45\ 10^{-9}$ |

DISCUSSION -

Les considérations théoriques faites précédemment ont permis d'aboutir à une expression permettant le calcul de la vitesse d'action enzymatique à partir des variations de la viscosité spécifique des solutions d'ADN. Ces résultats ne s'appliquent en toute rigueur que lorsque le modèle considéré pour l'ADN n'est pas modifié au cours de la réaction et que A reste constant. Les mesures d'absorption de la lumière ultraviolette montrent que puisqu'il n'y a pas ou peu de liaisons hydrogène rompues pendant la période de la réaction étudiée, la structure en double hélice de WATSON et CRICK doit donc être conservée.

La proportionnalité entre la viscosité intrinsèque et le poids moléculaire admise pour conduire le calcul, démontrée expérimentalement par THOMAS (100) dans le cas de l'hydrolyse enzymatique, doit être rapprochée du fait que la structure moléculaire demeure inchangée pendant la phase de la réaction étudiée. En effet, DOTY et coll (23) ont établi, expérimentalement, une relation similaire:

$$(\eta) = 1,45 \times 10^{-6} M^{1,12}$$

en mesurant $(\eta)$ et M sur des ADN dégradés par les ultrasons. Or on sait que, dans ce cas, la molécule conserve pendant la dégradation sa structure originelle en double hélice.

En ce qui concerne A, il ne semble devoir rester constant que lorsque la viscosité intrinsèque de l'ADN est supérieure à 2000. Le calcul ne doit donc être appliqué en toute rigueur qu'à des ADN dont la viscosité intrinsèque est élevée et à la période de la réaction pendant laquelle la viscosité intrinsèque de l'ADN est au moins égale à 2000 u CGS. Lorsque A n'est pas constant, pendant la période de la réaction étudiée, la viscosité spécifique décroît plus rapidement et l'on commet donc une erreur par excès dans la détermination de K et par là-même de v.

Le modèle d'APPLEQUIST ne rend pas compte de la période de latence observée dans la décroissance de la viscosité spécifique. Pour expliquer celle-ci, APPLEQUIST a admis entre son modèle et le matériel réel les différences suivantes.

Selon son modèle, dans une molécule de poids moléculaire M (provenant de la dégradation d'une chaîne infiniment longue) la relation entre la probabilité d'une simple coupure et le degré de polymérisation est, comme nous l'avons vu :

$$p = \sqrt{2}/\sqrt{P_w}$$

ce qui signifie que pour une molécule dont le degré de polymérisation est $P_w$ , il y a pour deux doubles coupures - les deux extrémités de la molécule - n coupures simples ou

$$n = p \times u$$

Au contraire, dans la molécule d'ADN telle qu'elle se présente au temps initial, il y a vraisemblablement très peu de coupures simples préexistantes dans la molécule et certainement beaucoup moins que ne l'exigerait le modèle d'APPLEQUIST. La relation $p' = p^2$ n'est donc pas satisfaite ($p' \gg p^2$). Au début de l'attaque de l'ADN par l'enzyme, seules des simples coupures apparaissent sur chaque chaîne sans entraîner de coupures de la double chaîne. Pendant cette période de latence, le poids moléculaire et donc la viscosité ne varie pas, et p augmente plus rapidement que p' . La concordance avec le modèle est atteinte lorsque p devient tel que

$$p' = p^2$$

Le temps requis pour que cette condition soit réalisée, et donc pour qu'il y ait concordance avec le modèle, représente le temps de latence. Il dépendra donc de la vitesse enzymatique et de la nature de l'ADN (nombre de simples coupures préexistantes).

Les résultats exposés, en ce qui concerne l'effet de la concentration enzymatique, de la concentration en ADN (variations linéaires de I/v avec I/c montrent qu'expérimentalement $V_1$ ou $V_2$ présente bien les caractéristiques d'une vitesse d'action enzymatique.

En ce qui concerne les variations de K et v avec A , ($\eta$) , et $M_o$ , il est particulièrement important de remarquer que des variations de ces dernières valeurs peuvent entraîner des différences importantes dans les valeurs de K, tout en n'ayant qu'une influence peu sensible sur v. Or jusqu'à maintenant il était courant de prendre comme mesure de l'activité DNasique la valeur de K ce qui peut conduire dans certains cas à des erreurs très importantes, puisque nous avons montré que pour une même vitesse de réaction enzymatique K pouvait varier dans le rapport de 1 à 10. KHOUVINE et GREGOIRE (50) avaient déjà remarqué que la façon dont on préparait l'ADN avait une certaine influence sur K. Toutefois, il n'est pas impossible que la vitesse de la réaction enzymatique dépende en partie des caractéristiques de l'ADN et que les différences avec des mêmes quantités d'enzyme, bien que peu significatives étant donné les imprécisions de mesure en particulier dans la détermination du poids moléculaire par

diffusion de la lumière, correspondent à une réalité biologique. En effet, KURNICK (56) a montré, par exemple, que l'ADN dénaturé par la chaleur était attaqué moins rapidement que l'ADN natif.

Nous n'avons pas considéré au cours de cette étude, l'effet éventuel sur K de la nature biologique de l'ADN utilisé. S'il existe sur la molécule d'ADN des liaisons préférentiellement attaquées, le nombre de ces liaisons va varier avec des ADN d'origines biologiques différentes, puisque les séquences sont différentes dans ces ADN. En fait, la variation du nombre des liaisons hydrolysables dans la molécule d'ADN revient à faire varier dans le modèle le poids du résidu R , et l'expression 26 VIII montre que v doit varier comme l'inverse de la racine carrée de R. Il est donc souhaitable d'effectuer toutes les mesures avec un ADN de même origine biologique.

# C H A P I T R E IX

## ETUDE DE LA DEGRADATION ENZYMATIQUE DE L'ADN COMPLEXE

Au cours de ce chapitre, nous présenterons la théorie générale de l'inhibition par excès de substrat due à REINER (80) puis nous serons amenés à en discuter les conditions d'application au cas de l'ADN. Nous verrons en particulier quelles sont les hypothèses qui doivent être formulées pour utiliser cette théorie dans ce cas, et quels sont les renseignements qui peuvent être obtenus (Détermination de certaines séquences de base dans la molécule d'ADN).

Les résultats expérimentaux permettront de juger et de discuter la validité des hypothèses avancées pour conduire cette expérimentation.

### I- THEORIE GENERALE DE L'INHIBITION PAR COMPLEXATION DU SUBSTRAT REINER (80) -

Deux cas sont à envisager :

1- L'inhibiteur se combine avec le substrat et diminue sa concentration effective.

2- L'inhibiteur se complexe avec le substrat et le complexe est lui-même un inhibiteur pour l'enzyme.

A - Cas a- diminution de la concentration effective en substrat.

$$E + S \underset{-1}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} C \qquad (1\ IX) \qquad C \underset{-2}{\overset{2}{\rightleftharpoons}} E + P \qquad (2\ IX) \qquad S + I \underset{-3}{\overset{3}{\rightleftharpoons}} S_i \qquad (3\ IX)$$

$$E_t = E + C \qquad (4\ IX)$$

$$S_t = S + S_i \qquad (5\ IX)$$

$$I_t = I + S_i \qquad (6\ IX)$$

On peut négliger S lié à E. On ne considère seulement que S libre, et S lié à $S_i$.

$$C = ES / K_I \qquad (7\ IX) \qquad v = k_2 C \qquad (8\ IX)$$

$$v = k_2 E_t S / (K_I + S) \qquad (9\ IX)$$

A partir de ces expressions, on peut trouver une relation pour S :

$$S_i = SI/K_3 \qquad (10\ IX)$$

Eliminons $S_i$ et I des équations :

$$S_i = S_t - S \qquad (11\ IX)$$

$$I = I_t - Si = I_t - S_t + S \qquad (12\ IX)$$

$$S = 1/2 \left( - (I_t - S_t + K_3) + \sqrt{(I_t - S_t + K_3)^2 + 4K_3S_t} \right) \qquad (13\ IX)$$

avec $K_3 = k_{-3}/k_3$

Si $I_t$ augmente, S diminue et tend vers zéro pour de très grandes valeurs de $I_t$. Finalement, S tend vers $S_t$ quand $S_t$ devient très grand.

Il est plus facile d'écrire cette expression de façon plus élégante en utilisant les variables r' et i définies comme suit :

r' = vitesse avec inhibiteur/vitesse sans inhibiteur

$$i = I - r' = \frac{\text{vit. sans inh. - vit. avec inh.}}{\text{vitesse sans inhibiteur}} \qquad (14\ IX)$$

$$r' = (S/K_I + S)/\left[S_t/(K_I + S_t)\right] \qquad (15\ IX)$$

$$i/(I - i) = K_I (S_t - S)/S(K_I + S_t) \qquad (16\ IX)$$

Or,

$$S_i = SI/K_3 \quad (17\ IX) \qquad I = K_3S_i/S \quad (18\ IX) \qquad S_i = S_t - S \quad (19\ IX)$$

$$I_t = K_3 (S_t - S)/S + (S_t - S) \qquad (20\ IX$$

$$I_t = (I + S_t/K_I)\left[K_3 (i/(I - i)) + S_t(i/(I-i)) / (I+(I+S_t/I)(i/(I-i))\right] \qquad (21\ IX)$$

Voyons maintenant quelles sont les variations de $I_t$ en fonction de $i/(I - i)$ :

a - $i/(I - i)$ petit ;

$(I + S_t/K_I)\, i/(I - i)$ est négligeable devant I

L'expression devient alors :

$$I_t = (I + S_t/K_I)(K_3 + S_t)\, i/(I - i) \qquad (22\ IX)$$

La pente à l'origine de la courbe est alors :

$$y_I = (I + S_t / K_I)\ (K_3 + S_t) \qquad (23\ IX)$$

b - $i/(I - i)$ très grand :

Ceci est réalisé quand i tend vers I

I est négligeable devant $(I + S_t / K_I)\ i/(I - i)$. On a alors :

$$I_t = (I + S_t / K_I)\ (K_3 i/(I - i) + S_t / I + S_t / K_I) \qquad (24\ IX)$$

$$\text{ou } I_t = i/(I - i)\ (I + S_t / K_I)\ K_3 + (I + S_t / K_I)\ (S_t / I + S_t / K_I) \qquad (25\ IX)$$

$$I_t = i/(I - i)\ (I + S_t / K_I)\ K_3 + S_t \qquad (26\ IX)$$

La courbe a pour asymptote la droite d'équation 26 IX . Cette droite coupe l'axe des ordonnées au point d'ordonnée $S_t$. L'allure générale de la courbe est représentée sur la figure 1 IX .

Nous pouvons distinguer ce cas d'inhibition de tout autre cas, facilement. En effet, pour une inhibition par complexation complète de l'enzyme, la représentation $I_t = f(i/(I - i))$ est analogue. Dans ce cas, la droite asymptote de la courbe, pour les grandes valeurs de $i/(I - i)$, coupe l'axe des ordonnées au point $E_t$. La valeur de l'ordonnée à l'origine distingue les deux cas, car les valeurs de $E_t$ et $S_t$ sont toujours très différentes.

B - <u>Cas b-</u> <u>Le complexe inhibiteur-substrat est inhibiteur.</u>

$$E + S \underset{-1}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} C \quad (27\ IX) \qquad C \xrightarrow{2} E+P \quad (28\ IX) \qquad S+I \underset{-3}{\overset{3}{\rightleftharpoons}} S_i \quad (19\ IX)$$

$$E + S_i \underset{-4}{\overset{4}{\rightleftharpoons}} C_i \quad (30\ IX)$$

$$I_t = I + S_i \quad (31\ IX) \qquad E_t = E + C + C_i \quad (32\ IX)$$

Ces deux équations sont dites de "conservation". Nous avons négligé $S_i$ dans l'expression de S pour simplifier les calculs, car la diminution de substrat n'est pas l'essence même de ce mécanisme qui est l'inhibition de l'enzyme par le substrat modifié $S_i$. Nous avons :

$$C = ES / K_I \quad (33\ IX) \qquad C_i = ES_i / K_4 \quad (34\ IX) \qquad S_i = SI / K_3 \quad (35\ IX)$$

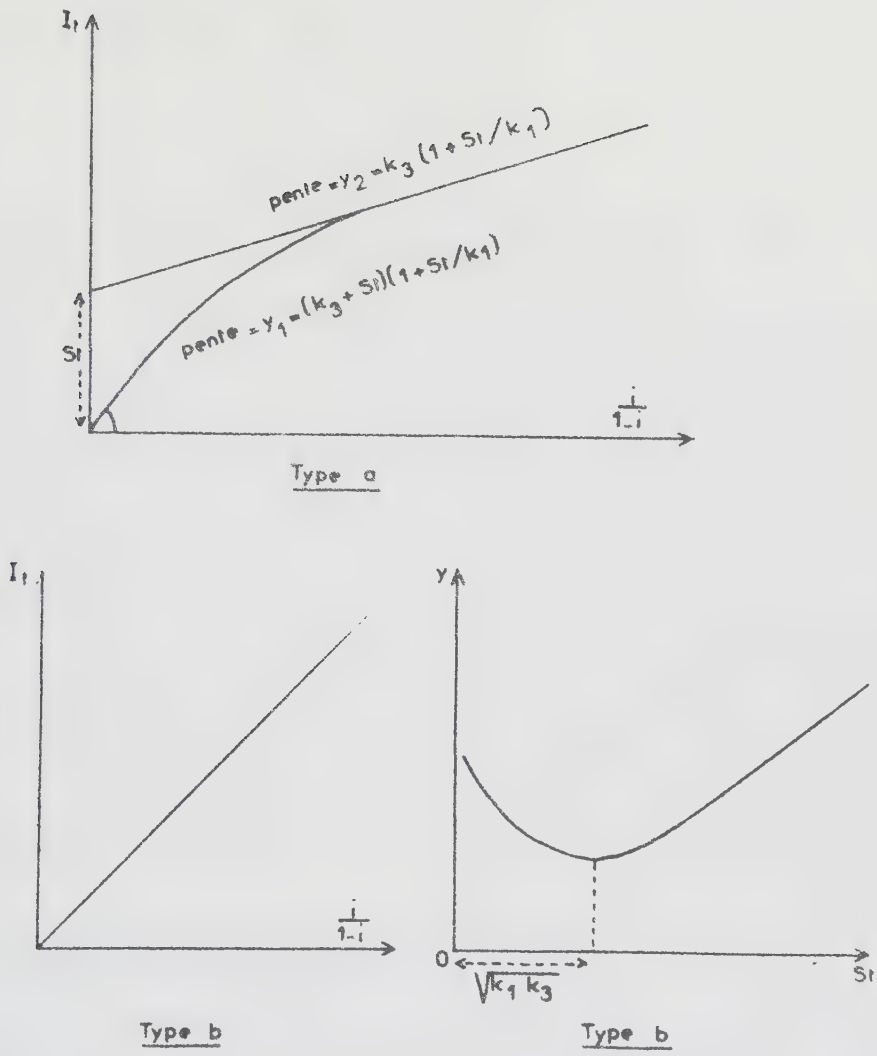



Figure 1 IX

Inhibition par complexation du substrat.

Courbes théoriques $I_t = f(i / (I - i))$ dans les cas a - et b - et $y = f(S_t)$ dans le cas b -.

Eliminons I de ces équations :

$$v = k_2 E_t S / (K_I + S + K_I S I_t K_4 (K_3 + S) \qquad (36\ IX)$$

où $K_3$ et $K_I$ sont les constantes d'équilibre :

$$K_4 = k_{-4} / k_4$$

La vitesse varie de sa valeur normale $v = k_2 E_t S / (K_I + S)$ à zéro quand $I_t$ augmente de zéro vers les très grandes valeurs.

Quand S devient très grand et quand I reste fini, le terme $K_I S I_t / K_4 (K_3 + S)$ tend vers $I_t K_I / K_4$ et v tend vers sa valeur maximale (vitesse non inhibée) $k_2 E_t$.

Cherchons $I_t = f(i / (I - i)$ comme précédemment :

$$I_t = (K_I + S)(K_3 + S) K_4 / K_I S \; i / (I - i) \qquad (37\ IX)$$

L'expression 37 IX est l'équation d'une droite passant par l'origine (figure 1 IX) ; sa pente est très grande pour les petites valeurs de S (figure 1 IX). Ceci pouvait être prévu puisque l'inhibiteur $S_i$ ne peut être formé sans S. $I_t$ devra être très grand pour qu'il y ait inhibition. Quand S croît la pente y diminue ; elle passe par un minimum pour $S = \sqrt{K_I K_3}$. Quand S devient très grand, la courbe $y = f(S)$ devient linéaire (figure 1 IX).

C - Combinaison des mécanismes a et b .

Si dans le cas précédent, nous tenons compte de $S_i$ dans l'équation de conservation de S, nous obtiendrons un résultat différent.

Avec les abréviations :

$$R = I + S_t / K_I \qquad (38\ IX) \qquad\qquad u = i / (I - i) \qquad (39\ IX)$$

$$I_t = K_4 Ru \left[ K_3 (S_t + K_4) + S_t / (S_t + K_4 (I + Ru)) \right] \qquad (40\ IX)$$

Cette courbe aura une portion initiale linéaire et une portion finale également linéaire. La pente initiale $y_I$ est :

$$y_I = K_4 R (K_3 + S_t) / (K_4 + S_t) \qquad (41\ IX)$$

Cette expression ressemble à l'expression 23 IX , elle peut être considérée comme une fonction de $S_t$, elle possède un minimum puisque :

$$dy_I / dS_t = (K_4/K_I)\ (S_t^2 + 2\ K_4 St + K_4\ (K_I + K_3) - K_I K_3) / (K_4 + S_t)^2 \quad (42\ IX)$$

Quand $S_t$ tend vers zéro, $dy_I / dS_t$ tend vers :

$$K_4 / K_I\ (K_4\ (K_I + K_3) - K_I K_3) / K_4^2 \qquad (43\ IX)$$

Quand $S_t$ devient très grand, $dy_I / dS_t$ tend vers $K_4 / K_I$

Les courbes de la figure 2 IX résument les différents cas possibles. La pente finale de la courbe $I_t = f\ (u)$ est calculée en déterminant la limite de $y_2$ quand u devient très grand. On a :

$$\text{Lim}\ \ y_2 = K_4\ RK_3 / (S_t + K_4) \qquad (44\ IX)$$

La pente finale $y_2$ est plus petite que la pente initiale $y_I$. L'intersection, avec l'axe des ordonnées, de l'asymptote à la courbe $I_t = f(u)$ pour les grandes valeurs de u est comme dans le cas a -, $S_t$ . L'allure de la courbe $I_t = f\ (u)$ est dans ce cas semblable à celle obtenue dans le cas a -. Seules les variations de $y_I$ et $y_2$ avec $S_t$ permettent de distinguer les deux cas. La figure 2 IX représente les variations de $y_2$ et $y_I$ en fonction de S dans les deux cas. Ce dernier cas peut être considéré plus simplement comme la superposition des deux types d'inhibition a - et b - décrits précédemment.

## II- APPLICATION DE LA THEORIE DE L'INHIBITION PAR COMPLEXATION DU SUBSTRAT AU CAS D'UN HAUT POLYMERE · SYSTEME ADN-DESOXYRIBONUCLEASE, HYPOTHESES NECESSAIRES, DISCUSSION -

Les théories et les calculs concernant la cinétique enzymatique, et en particulier la théorie de l'inhibition par complexation du substrat, ne peuvent s'appliquer directement au cas du système ADN - DNase.

En effet, dans tous ces calculs, on considère qu'une molécule de substrat ne peut réagir qu'avec une seule molécule d'enzyme. Ceci est donc très différent de ce qui se passe dans le cas de l'ADN, où une molécule d'enzyme est

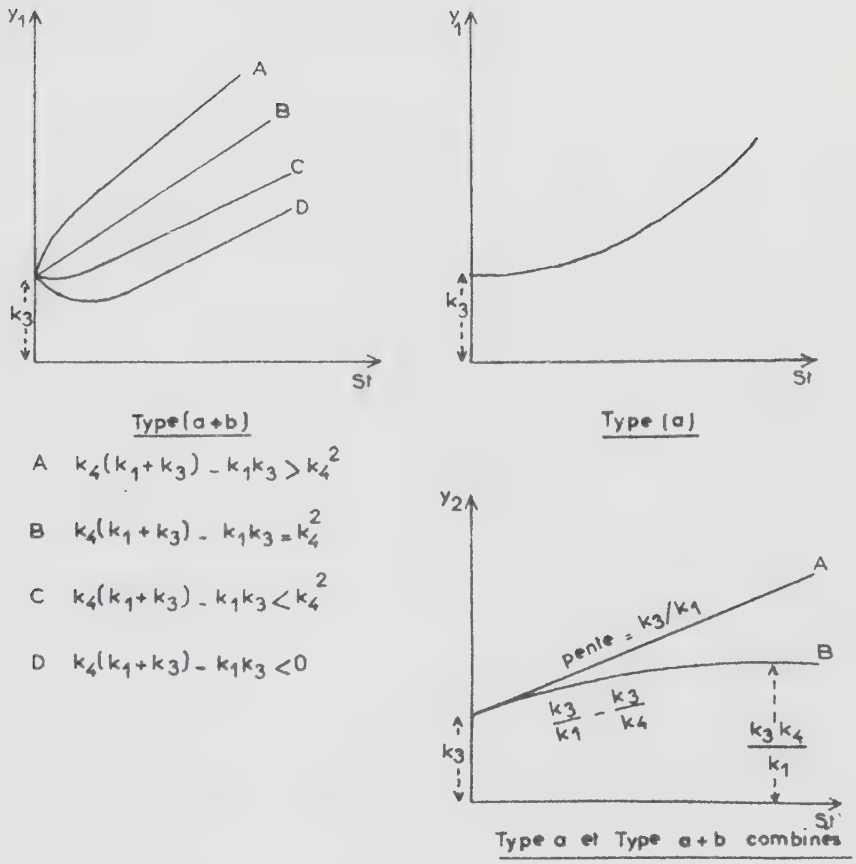



Figure 2 IX

Inhibition par complexation du substrat

Courbes théoriques $y_I = f(S_t)$ et $y_2 = f(S_t$ dans les cas a - et a + b -

susceptible de réagir un grand nombre de fois avec le substrat. Le calcul complet pour un tel système n'a pas été fait. Il serait d'ailleurs très compliqué. Il faudrait pouvoir isoler chaque réaction élémentaire et en étudier sa cinétique. Toute les coupures n'étant pas également probables, pour faire le calcul, il faudrait considérer chaque site indépendant et calculer les constantes d'affinité de chacun de ces sites pour l'enzyme. Le nombre de sites étant très élevé, le calcul serait inextricable. Le nombre d'inconnues étant trop grand, l'intérêt d'un tel calcul serait faible, tout au moins pour son application pratique.

Pour tenter d'appliquer les théories classiques à ce système, nous avons pour simplifier le problème associé à chaque coupure possible un site. De plus, nous avons identifié la molécule de substrat des théories classiques au support moléculaire du site. Nous parlerons maintenant de molécules de site. Pour matérialiser cette expression et la rendre moins abstraite, imaginons une chaîne moléculaire quelconque. Cette chaîne est susceptible d'être coupée en n points quelconques distribués au hasard ou de façon ordonnée (l'ordre n'étant alors qu'un cas particulier) . Considérons les points qui se trouvent sur cette chaîne à égale distance de deux coupures possibles, c'est-à-dire à égale distance de deux sites. Nous définirons alors la molécule de site comme la partie moléculaire comprise entre deux de ces points. Le poids moléculaire de cette molécule de site sera alors le poids de la chaîne qui supporte ce site. Il est alors facile de considérer chaque site comme indépendant de son voisin. Chaque molécule de site peut être alors identifiée à la molécule de substrat considérée dans les théories classiques.

Le modèle ainsi imaginé est donc très simple et de caractère général. Le problème qui se pose à nous maintenant est de savoir dans quelles conditions ce modèle peut s'appliquer à l'ADN. Nous présenterons maintenant quelques arguments permettant d'admettre ce modèle comme hypothèse de travail sans postuler d'absurdités. Nous verrons par la suite comment nos résultats expérimentaux s'accordent avec ces hypothèses et peuvent conduire à une première analyse globale de la distribution des bases le long de la chaîne polynucléotidique.

Nous avons précédemment discuté la spécificité de la DNase I pancréatique, et nous avons vu que l'on pouvait admettre que cet enzyme hydrolysait préférentiellement les liaisons p.Pu p.Py à l'exception de la liaison pGpC. C'est-à-

dire que ces liaisons peuvent être considérées comme des sites dont l'affinité pour l'enzyme est plus élevée que pour tout autre. En première approximation, il est raisonnable de considérer sur la molécule deux sortes de sites

- les sites (pPupPy - pGpC) à haute affinité pour l'enzyme ;
- tous les autres sites considérés comme identiques et ayant pour l'enzyme une très faible affinité.

Pour l'étude de la réaction pendant la période initiale, où le nombre de liaisons hydrolysées est faible devant le nombre de liaisons totales, il est possible de négliger l'importance de la deuxième espèce de site. Dans ce cas, chaque molécule de site est considérée comme le support d'une liaison (pPupPy - pGpC). Le nombre de sites mesure donc le nombre de ces enchaînements et permet ainsi d'avoir une idée de la séquence des bases le long de la chaîne polynucléotidique.

De plus, il est extrêmement raisonnable d'admettre l'indépendance de chaque site étant donné le grand nombre de sites vis-à-vis de molécules d'enzymes. La probabilité que l'interaction de deux molécules d'enzymes avec deux sites voisins soit entravée par le fait d'empêchement stérique par exemple, est très faible.

En résumé, le modèle décrit fournit un moyen simple d'appliquer les théories classiques au cas de l'ADN et des polymères déployés. Il suffit d'associer à chaque coupure possible un site et d'individualiser ce site en une molécule que nous avons appelée molécule de site et qui devient identique à la molécule de substrat des théories enzymatiques classiques.

L'étude théorique de l'inhibition par complexation du substrat peut alors s'appliquer et de nombreuses grandeurs vont être alors accessibles :

- $K_I$ constante de dissociation enzyme-substrat assimilable à la constante de MICHAELIS.
- $K_3$ constante de dissociation inhibiteur-substrat
- $S_t$ nombre de molécules de sites.

Cette dernière valeur permet de calculer le nombre de séquences (pPupPy - pGpC ) par molécule d'ADN.

Nous verrons, au cours de ce travail, comment les différents résultats expérimentaux, en s'accordant avec des résultats précédemment établis par d'autres méthodes, permettent de montrer la validité des hypothèses avancées pour interpréter les résultats obtenus dans l'étude de l'inhibition de la DNase par complexation de l'ADN.

## III- NECESSITE THEORIQUE D'UNE TECHNIQUE TRES PRECISE DE MESURE DES VITESSES DE REACTION ADN - DNase -

Nous avons vu au cours de la théorie de l'inhibition par complexation du substrat que la grandeur qui mesurait l'inhibition était $i/(I - i)$ où i est :

$$i = \frac{\text{vitesse sans inh. - vitesse avec inh.}}{\text{vitesse sans inhibiteur}} = \frac{V_s - V_i}{V_s}$$

Si $\Delta i$ est la limite supérieure de l'erreur commise sur i, on a :

$$\frac{\Delta (i/(I - i))}{i/(I - i)} = \Delta i/i + \Delta i/(I - i) = \Delta i/i\,(I - i)$$

$$\Delta i/i = V_i\,\Delta V_s / V_s\,(V_s - V_i) + \Delta V_i / (V_s - V_i)$$

si $\Delta V_s \neq \Delta V_i$

$$\Delta i\, i \leqslant \frac{\Delta V(V_s + V_i)}{V_s\,(V_s - V_i)}$$

$$\Delta\left(i/(I - i)\right)/i/(I - i) \leqslant \frac{\Delta V\,(V_s + V_i)}{V_s\,(V_s - V_i)} \times \frac{I}{I - i}$$

Comme $i \longrightarrow I$ très rapidement, $I/(I - i)$ devient grand, et l'erreur commise $\Delta\,(i/(I - i)/i/(I - i)$ devient rapidement très importante. Il est donc absolument indispensable de mesurer V avec une très bonne précision. C'est pourquoi nous avons utilisé la viscosimétrie. Nous avons discuté au chapitre précédent les conditions d'utilisation de cette méthode.

## IV- RESULTATS EXPERIMENTAUX -

Les mesures à effectuer et la façon dont on effectue ces mesures découlent directement des considérations théoriques faites précédemment. Les mesures de dégradation enzymatique de l'ADN sont faites par viscosimétrie. Nous avons discuté les conditions d'utilisation de cette technique au chapitre VIII. Nous avons étudié la dégradation enzymatique de l'ADN, complexé à deux sortes de deux colorants : la quinacrine et le vert de méthyle.

### A - CAS DE L'ADN - QUINACRINE -

Toutes les expériences ont été effectuées à t = 25° C. La composition des solutions sur lesquelles sont effectuées les mesures, est résumée sur le tableau 1 IX. Les solutions de chlorhydrate de quinacrine sont toujours préparées extemporanément. L'ordre de mélange des différents réactifs est celui du tableau 1 IX. Après l'addition de la solution de quinacrine, les solutions sont soigneusement agitées, puis sont abandonnées à l'obscurité pendant quelques heures, afin que les différents équilibres soient atteints La solution de DNase n'est ajoutée qu'au moment de la mesure. Les mesures de viscosité spécifique en fonction du temps, sont faites dans les conditions précisées ci-dessus (Chapitre VIII) .

La première constatation à effectuer est que la viscosité spécifique des solutions au temps zéro varie avec la quantité de quinacrine ajoutée. Les résultats sont résumés sur le tableau 3 IX. La figure 3 IX représente les variations de cette viscosité spécifique avec la quantité de quinacrine ajoutée. On voit donc que, dans ces conditions expérimentales, il se forme bien un complexe entre l'ADN et la quinacrine. Cette propriété, comme le montre le résultat de nombreux auteurs, semble être une propriété générale des dérivés acridiniques, et est en relation directe avec le pouvoir mutagénique si connu de ces substances. De plus, la formation de complexes entre la quinacrine et l'ADN avait déjà été signalée par KURNICK (58) .

L'expression des résultats est compliquée par le fait que la viscosité spécifique des solutions au temps zéro varie, et que les vitesses de décroissance de la viscosité spécifique en fonction du temps, qui mesurent

# T A B L E A U 1 IX

## ETUDE DE LA DEGRADATION DU COMPLEXE ADN-QUINACRINE PAR LA DNase I : COMPOSITION DES SOLUTIONS

| | T | I | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ADN (2 mg/ml) | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| Quinacrine (0,5mg/ml) | 0 | 0,2 | 0,5 | 1 | 1,5 | 1,7 | 1,8 | 1,9 | 2,5 |
| $Mg^{++}$ 0,3 M | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Tampon tris pH 7,5 0,4 M | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| ClNa 0,14 M | 7 | 6,8 | 6,5 | 6,0 | 5,5 | 5,3 | 5,2 | 5,1 | 4,5 |
| DNase I µg/ml | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |

l'action enzymatique, doivent être corrigées en tenant compte de cette variation. Le nombre de particules responsables de la viscosité des solutions n'est pas modifié mais la contribution de chacune de ces particules à la viscosité est augmentée. Il en résulte que lorsqu'une de ces particules est coupée, la chute de viscosité est plus importante, la pente de la courbe $\eta_{sp} = f(t)$ est donc augmentée.

Nous avons vu que la vitesse de dégradation de l'ADN sous l'action de la DNase pouvait être déterminée par viscosimétrie à partir de la relation :

$$- v = \frac{K}{2 A(\eta_o)^2 c + (\eta_o)} \times \frac{I}{\sqrt{\eta_o}}$$

Lors de la fixation de la quinacrine sur l'ADN, la concentration en matériel responsable de la viscosité des solutions est augmentée, la viscosité intrinsèque des particules est également modifiée. De plus, nous ne pouvons rien connaître des variations subies par A. On voit dans ce cas, que l'expression exacte de v en fonction de K serait très difficile, même avec des connaissances très précises sur les modalités d'association de la quinacrine avec l'ADN. Dans l'impossibilité de trouver à ce problème de solution rigoureuse, nous avons fait l'approximation suivante : nous avons admis que dans l'intervalle considéré, K variait proportionnellement à $\eta_{sp_o}$ et nous avons pris comme mesure de la vitesse d'action enzymatique K ramené à une même valeur de $\eta_{sp_o}$ celle du témoin. Toutefois cette étude expérimentale conduisant à la détermination de valeurs pouvant être déterminées d'une autre façon en particulier $K_M$ (constante de MICHAELIS de la DNase , s'il existe une concordance même approchée entre les résultats obtenus par deux méthodes différentes, nous pourrons considérer que l'approximation ainsi faite a conduit à une approximation satisfaisante du problème.

De plus, nous verrons en comparant les résultats corrigés et non corrigés que la nature des corrections effectuées ne peut influencer de façon importante la détermination de $S_t$. Par contre elles interviennent de façon prépondérante dans le calcul de $K_M$ ; il sera donc très intéressant de comparer ces valeurs.

Les résultats expérimentaux sont rapportés sur les tableaux 2 IX et 3 IX et les figures 3, 4, 5, 6 et 7 IX. On peut voir sur la figure 7 IX que, avec ou sans correction, la courbe $I_t = f[i/(I - i)]$ a bien l'allure prévue par

# T A B L E A U 2 IX

## VITESSES DE DEGRADATION (NON CORRIGEES) DU COMPLEXE ADN-QUINACRINE

| | Quinacrine micro-moles/ml x $10^2$ | V (non corrigé) | i | I-i | i/(I-i) |
|---|---|---|---|---|---|
| T | 0 | 72 | 0 | 1 | 0 |
| 1 | 1,77 | 67 | 0,07 | 0,93 | 0,075 |
| 2 | 4,45 | 60 | 0,167 | 0,833 | 0,20 |
| 3 | 8,9 | 49 | 0,32 | 0,68 | 0,47 |
| 4 | 13,2 | 35 | 0,515 | 0,485 | 1,06 |
| 5 | 15,0 | 31 | 0,57 | 0,43 | 1,32 |
| 6 | 15,9 | 27 | 0,625 | 0,375 | 1,67 |
| 7 | 16,8 | 27 | 0,625 | 0,375 | 1,67 |
| 8 | 22,0 | 18 | 0,75 | 0,25 | 3,0 |

# T A B L E A U 3 IX

## VITESSES DE DEGRADATION (CORRIGEES) DU COMPLEXE ADN-QUINACRINE

(i/(I-i) étant indépendant de la façon dont on mesure V, donc des unités V est mesuré pour la commodité des calculs comme la chute de viscosité spécifique en 5 minutes).

| | Quinacrine micro-moles/ml $x10^2$ | V | V (corrigé) | i | I-i | i/(I-i) | η sp° |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| T | 0 | 72 | 72 | 0 | 1 | 0 | 3,02 |
| 1 | 1,77 | 67 | 67 | 0,07 | 0,93 | 0,075 | 3,04 |
| 2 | 4,45 | 60 | 57 | 0,21 | 0,79 | 0,26 | 3,38 |
| 3 | 8,9 | 49 | 36 | 0,5 | 0,5 | 1,0 | 4,1 |
| 4 | 13,2 | 35 | 24,5 | 0,66 | 0,34 | 1,94 | 4,3 |
| 5 | 15 | 31 | 21 | 0,72 | 0,28 | 2,57 | 4,5 |
| 6 | 15,9 | 27 | 18,5 | 0,744 | 0,256 | 2,90 | 4,45 |
| 7 | 16,8 | 27 | 18 | 0,75 | 0,25 | 3,0 | 4,5 |
| 8 | 22 | 18 | 11 | 0,85 | 0,15 | 5,75 | 4,88 |

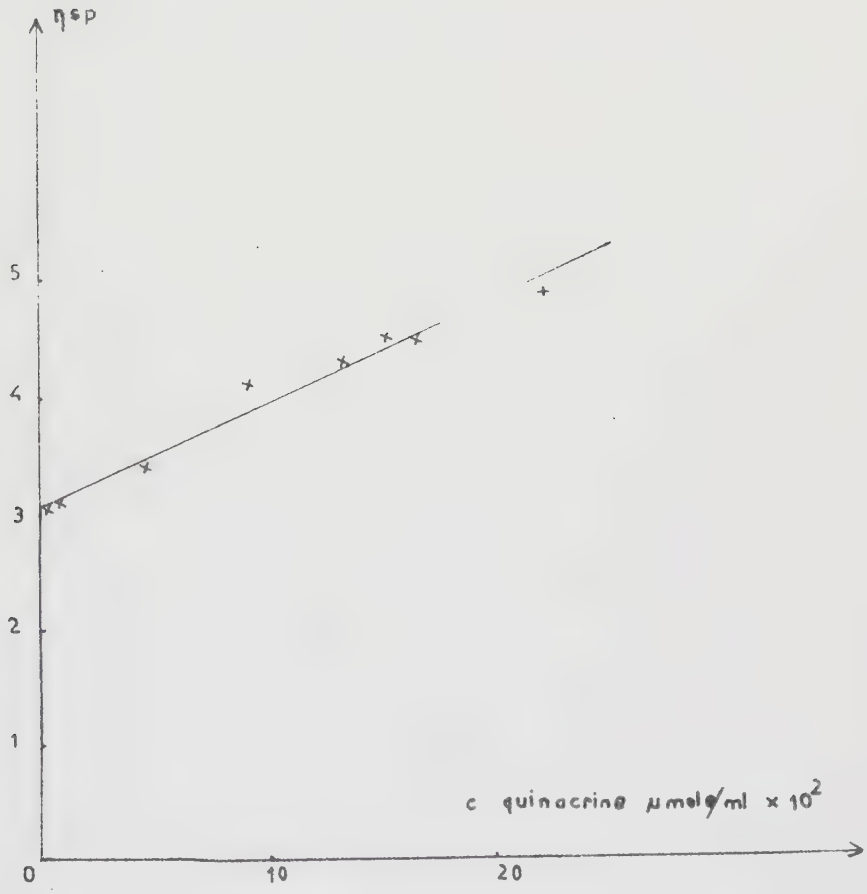



Figure 3 IX

Variation de la viscosité spécifique de la solution d'ADN en fonction de la concentration en quinacrine.

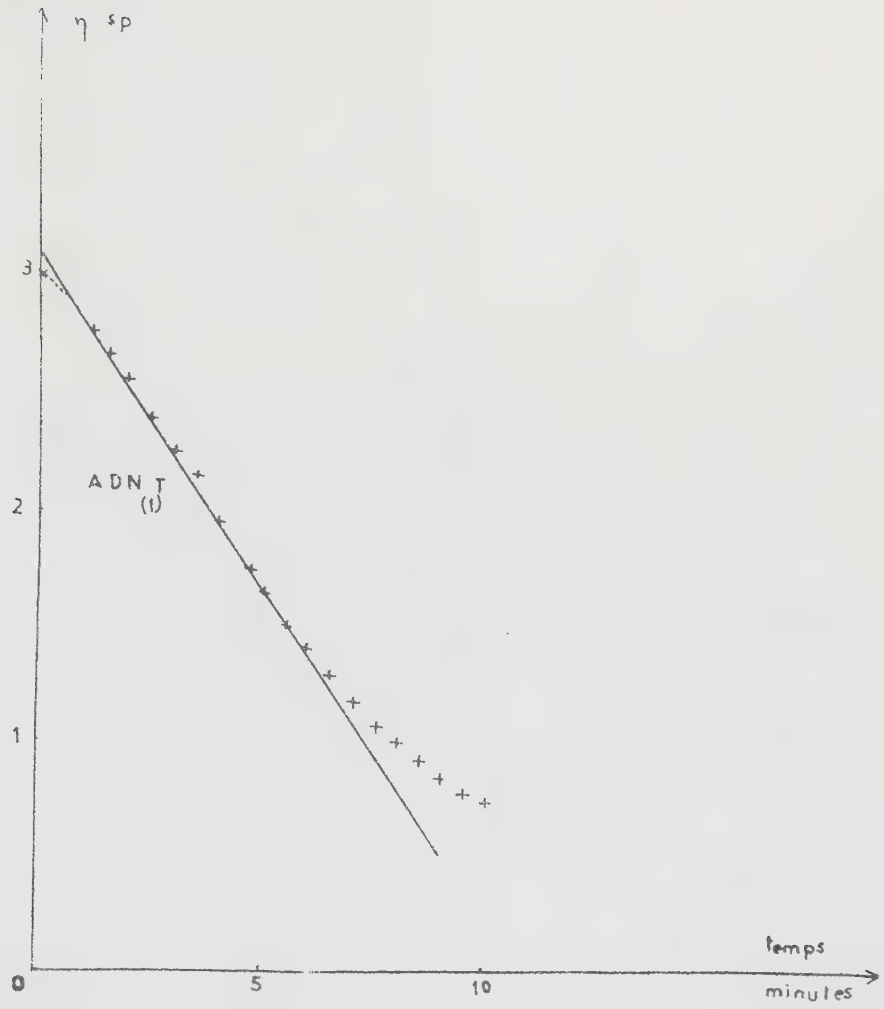



Figure 4 IX

ADN - QUINACRINE : Variation de la viscosité spécifique de la solution d'ADN témoin sous l'effet de la DNase en fonction du temps.

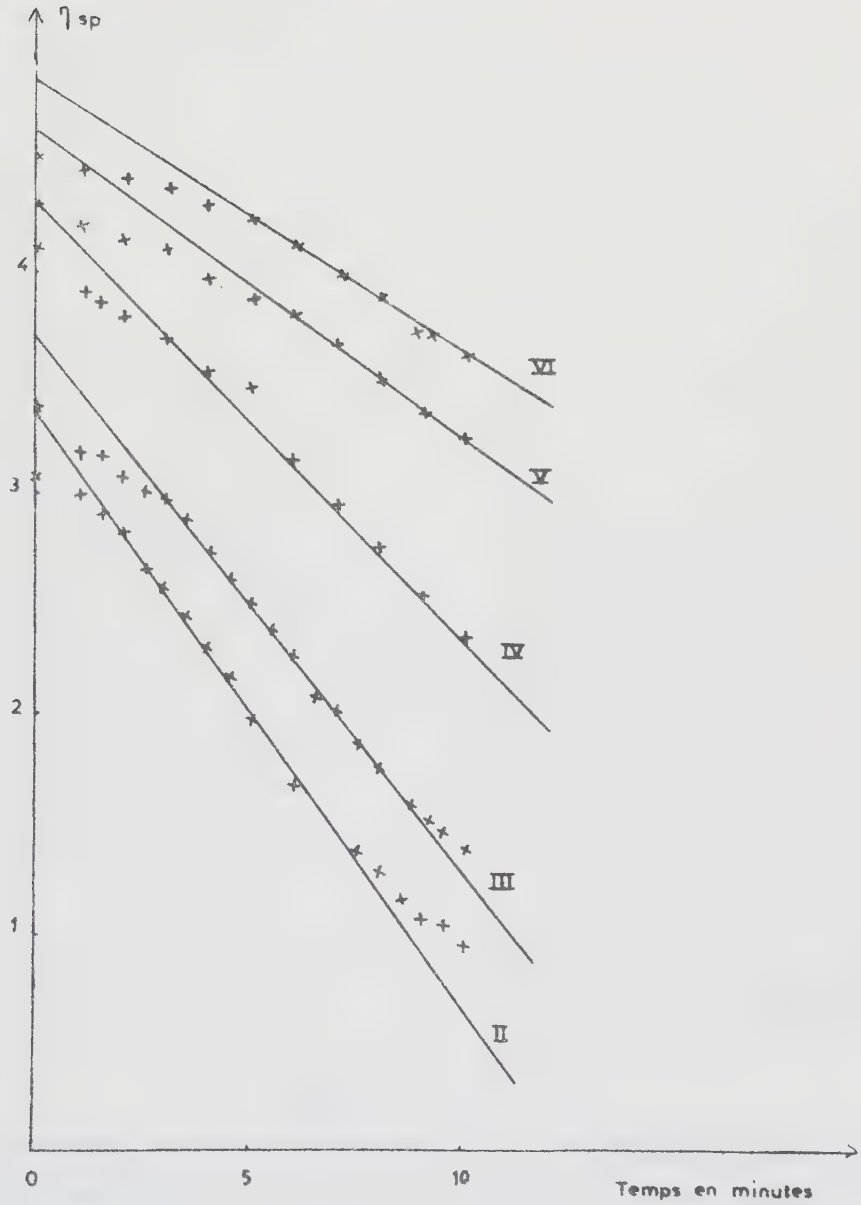



Figure 5 IX

ADN-QUINACRINE : Variations de la viscosité spécifique de la solution d'ADN sous l'effet de la DNase en fonction du temps, et en présence de quantités variables de quinacrine. Le numéro de chaque courbe correspond aux numéros des solutions du tableau.

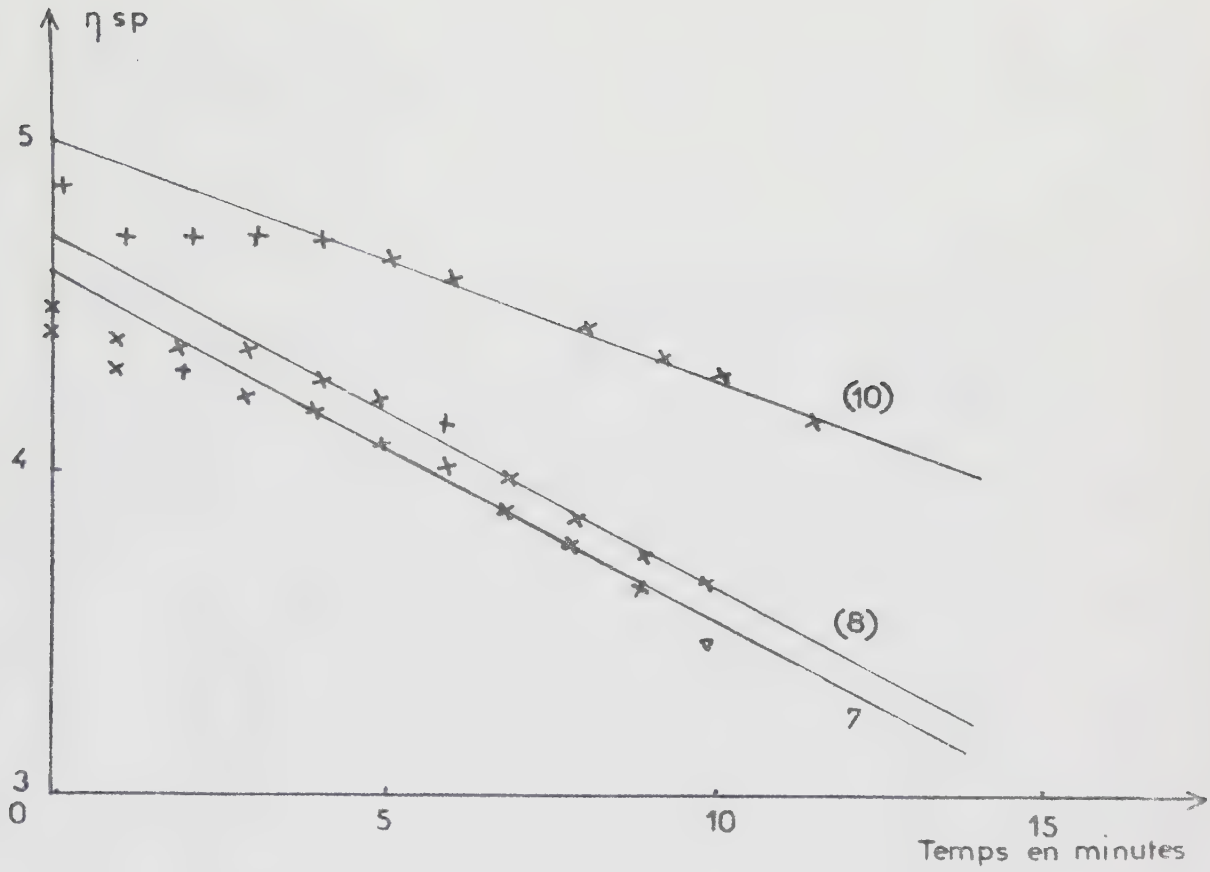



Figure 6 IX

ADN-QUINACRINE : Variations de la viscosité spécifique de la solution d'ADN sous l'effet de la DNase en fonction du temps, et en présence de quantités variables de quinacrine. Le numéro de chaque courbe correspond aux numéros des solutions du tableau.

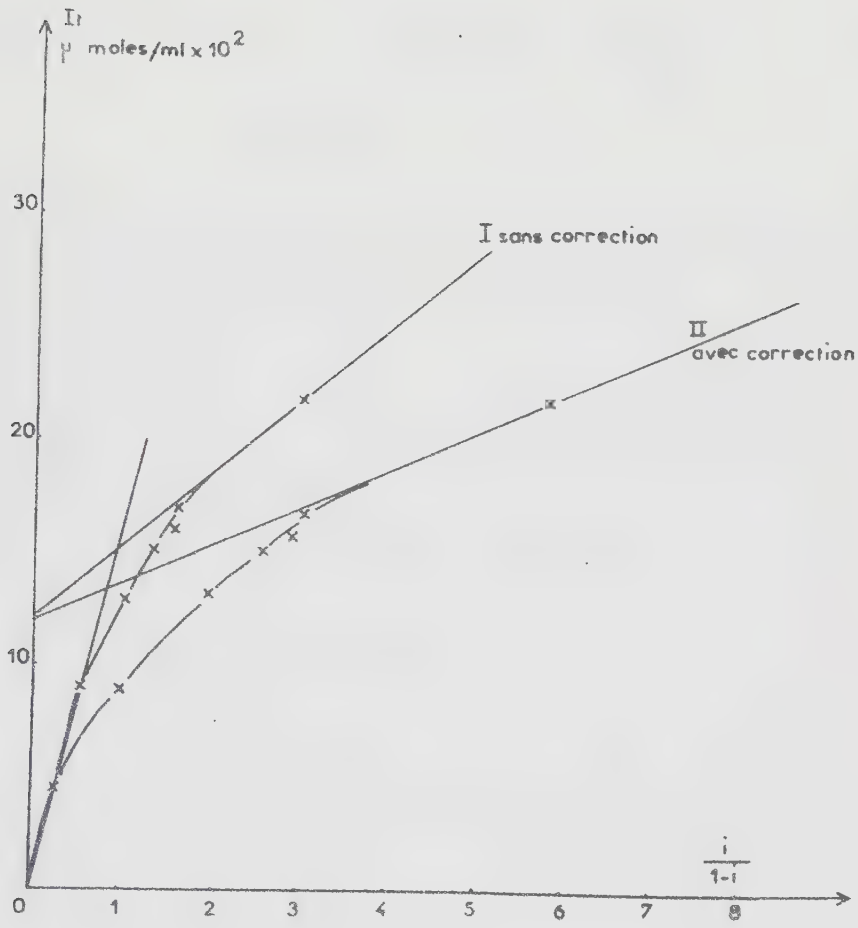



Figure 7 IX

ADN-QUINACRINE . Variations de la fonction $I_t = f\left[i / (I - i)\right]$ .

la théorie, et que cette courbe est asymptote pour les grandes valeurs de $i/(I - i)$ à une droite coupant l'axe des ordonnées au point d'ordonnée $S_t$.

Expérimentalement, la valeur de $S_t$ est trouvée :

$$S_t = 12 \ 10^{-8} \text{ moles / ml.}$$

La concentration en ADN étant dans ce cas de 250 µg / ml, le poids moléculaire d'une molécule de site est donc dans ces conditions :

$$\frac{250 \ 10^{-6}}{12 \ 10^{-8}} = 2100$$

Le poids moléculaire moyen d'un nucléotide étant de 330 environ, une molécule de site correspond sensiblement à 6 nucléotides.

Calcul de $K_I$ $(K_M)$ et $K_3$

Les pentes initiales et finales de la courbe $I_t = f(i/(I - i))$ sont respectivement :

$$y_I = (S_t + K_3)(I + S_t / K_I)$$

$$y_2 = K_3 (I + S_t / K_I)$$

$$y_I / y_2 = S_t / K_3 + I$$

Ces expressions permettent de calculer $K_3$ puis $K_I$

$$K_I K_3 + K_3 S_t = y_2 K_I$$

$$K_I = K_3 S_t / (Y_2 - K_3)$$

Dans le cas du système ADN - quinacrine, on a :

$$y_I = 0{,}16 \ 10^{-6} \qquad y_2 = 0{,}018 \ 10^{-6}$$

$$y_I / y_2 = 9 \qquad S_t / K_3 = 8$$

$$K_3 = 0{,}015 \ 10^{-8}$$

$$K_I = 0{,}6 \ 10^{-6} \text{ moles / ml.}$$

CAS ADN - VERT DE METHYLE -

Le schéma des expériences est semblable à celui adopté dans le cas du système ADN - Quinacrine. La composition des solutions sur lesquelles sont effectuées les mesures est résumée sur le tableau 4 IX pour l'expérience N° 1 et sur le tableau 6 IX pour l'expérience n° 2. Les corrections sont faites de la même façon que dans le cas ADN - Quinacrine. Les variations de la viscosité spécifique au temps zéro mettent en évidence la formation d'un complexe entre l'ADN et le vert de méthyle. Les conditions de formation de ce complexe ont été étudiées par KURNICK (57).

Comme dans le cas précédent, l'allure des variations de la courbe $I_t = f(i/(I - i)$ est tout à fait celle prévue par la théorie. Les résultats expérimentaux sont rapportés sur les tableaux 5 et 7 IX et sur les figures 8, 9, 10 et 11 IX .

Dans le premier cas :

$$S_t = 14 \ 10^{-8} \text{ moles/ml} \quad c(\text{ADN}) = 325 \ \mu g/\text{ml}.$$

Le poids moléculaire de la molécule de site est donc :

$$325 \ 10^{-6} / 14 \ 10^{-8} = 2300$$

Dans le deuxième cas :

$$S_t = 18 \ 10^{-8} \text{ moles/ml} \qquad c(\text{ADN}) = 365 \ \mu g/\text{ml}.$$

Le poids moléculaire de la molécule de site est donc :

$$365 \ 10^{-6} / 18 \ 10^{-8} = 2000$$

Une molécule de site correspondrait donc à 7 ou 6 nucléotide dans l'un et l'autre cas.

Dans ce système, la pente à l'origine de la courbe $I_t = f(i/(I - i)$ n'est pas suffisamment bien définissable dans ces conditions expérimentales pour permettre un calcul des différentes constantes.

DISCUSSION -

Ayant déjà discuté les conditions d'application de la théorie de l'inhibition par complexation du substrat à ce système, nous nous attacherons maintenant à discuter la signification des résultats obtenus lors de cette étude.

# T A B L E A U 4 IX

## ETUDE DE LA DEGRADATION DU COMPLEXE ADN-VERT DE METHYLE PAR LA DNase I : COMPOSITION DES SOLUTIONS (1)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ADN V72 2,6 mg/ml | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 |
| $Mg^{++}$ 0,3M | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Tampon tris pH 7,5 0,4 M | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| ClNa 0,14 M | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Vert de méthyle 0,02% | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 3 | - | - | - | - | - |
| Vert de méthyle 0,2% | - | - | - | - | - | 0,5 | 1 | 2 | 3 | 5 |
| Eau distillée | 5 | 4,5 | 4 | 3 | 2 | 4,5 | 4 | 3 | 2 | 0 |
| Dnase Iμg/ml | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |

# T A B L E A U 5 IX

## ETUDE DE LA DEGRADATION DU COMPLEXE ADN-VERT de METHYLE par la DNase I : RESULTATS EXPERIMENTAUX (1)

| | Colorant micro-moles/ml x $10^2$ | η sp° | V | V (corrigé) | i | I-i | i/(I-i) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | 0 | 3,3 | 3,44 | 3,44 | 0 | 1 | 0 |
| 2 | 1,81 | 3,21 | 2,9 | 2,9 | 0,157 | 0,843 | 0,187 |
| 3 | 3,62 | 3,24 | 2,1 | 2,1 | 0,39 | 0,61 | 0,64 |
| 4 | 7,25 | 3,78 | 1,58 | 1,35 | 0,61 | 0,39 | 1,57 |
| 5 | 10,85 | 4,03 | 0,87 | 0,67 | 0,805 | 0,195 | 4,15 |
| 6 | 18,1 | 4,3 | 0,28 | 0,21 | 0,935 | 0,062 | 15,7 |
| 7 | 36,2 | 4,75 | - | - | - | - | - |
| 8 | 72,5 | 5,5 | 0,03 | 0,018 | 0,995 | 0,005 | 200 |
| 9 | 108 | 6,5 | $\longrightarrow 0$ | - | - | - | $\longrightarrow \infty$ |
| 10 | 181 | 9,55 | $\longrightarrow 0$ | - | - | - | $\longrightarrow \infty$ |

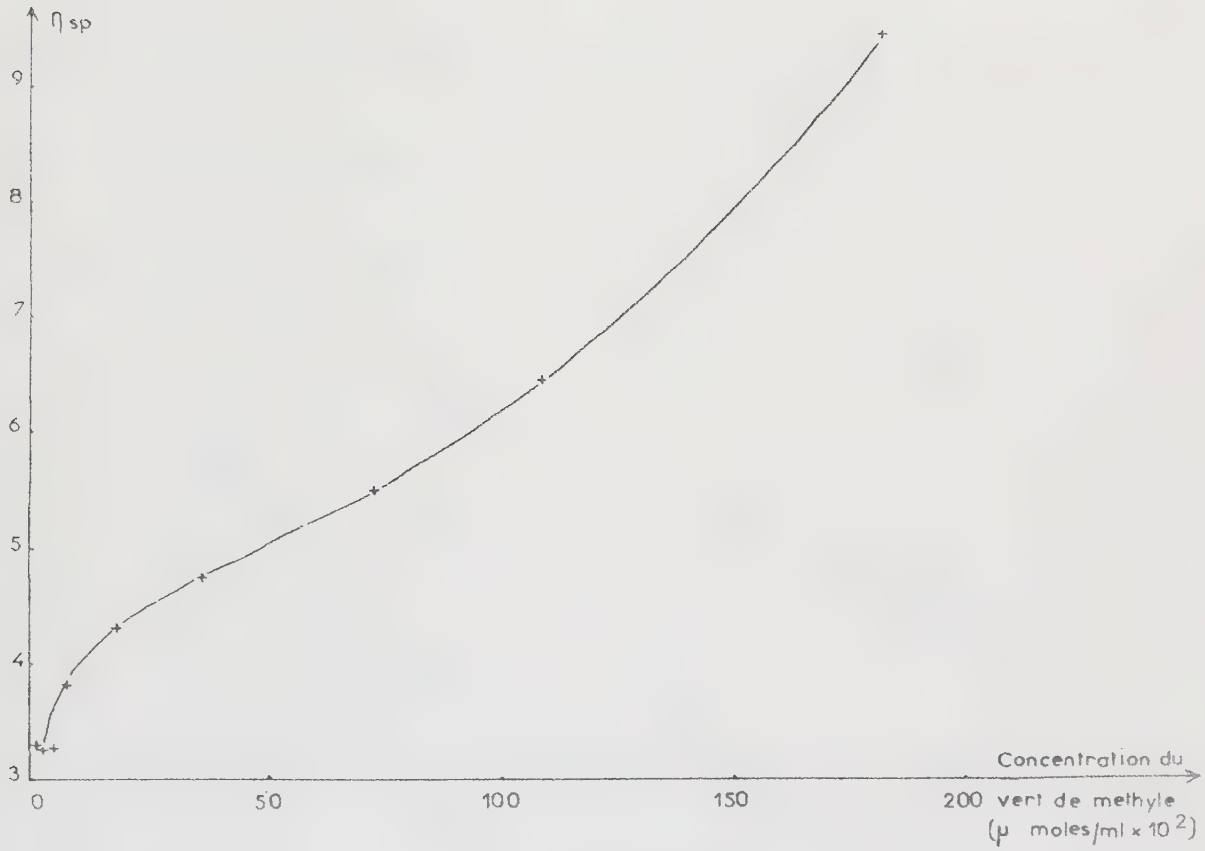



Figure 8 IX

ADN-VERT DE METHYLE : Variations de la viscosité spécifique de la solution d'ADN en fonction de la concentration en vert de méthyle.

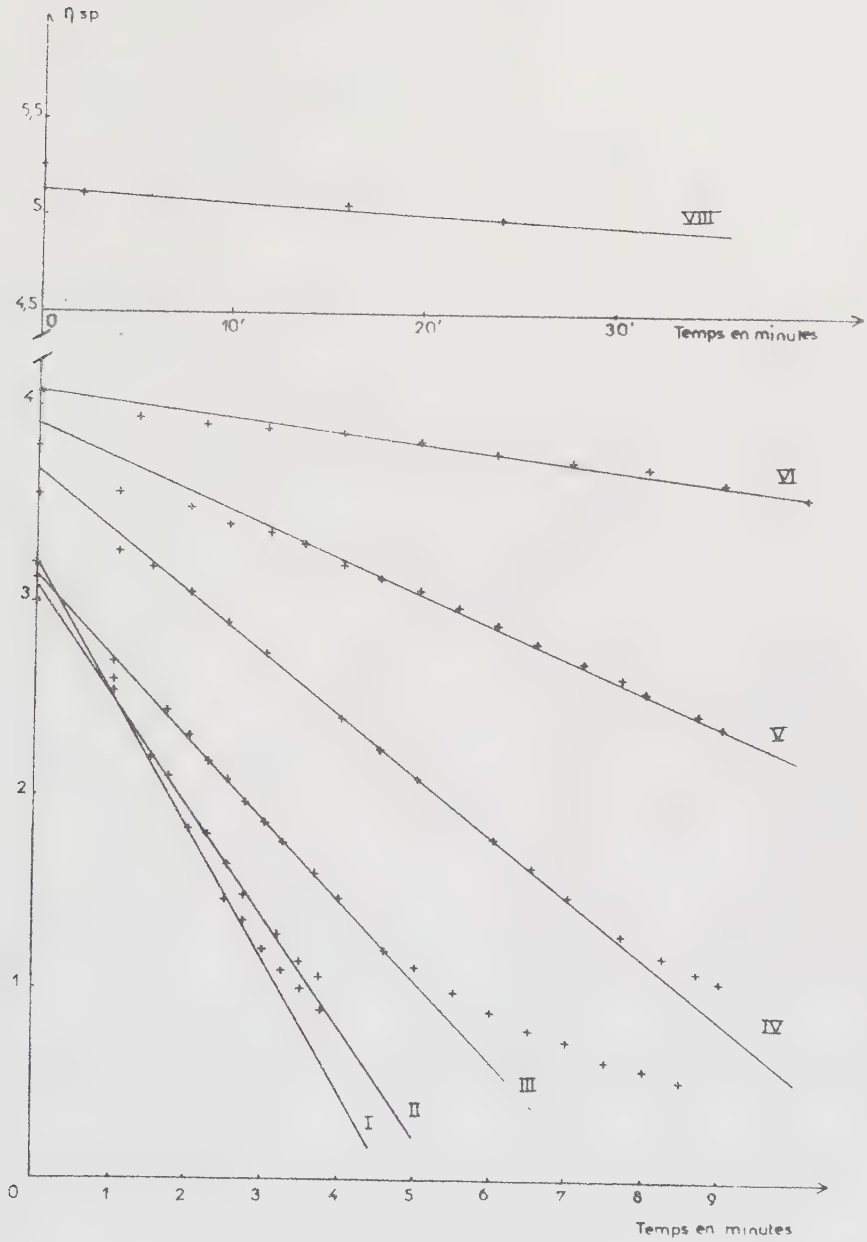



Figure 9 IX

ADN-VERT DE METHYLE (I : Variations de la viscosité spécifique de la solution d'ADN sous l'effet de la DNase en fonction du temps, et en présence de quantités variables de vert de méthyle. Le numéro de chaque courbe correspond aux numéros des solutions du tableau.

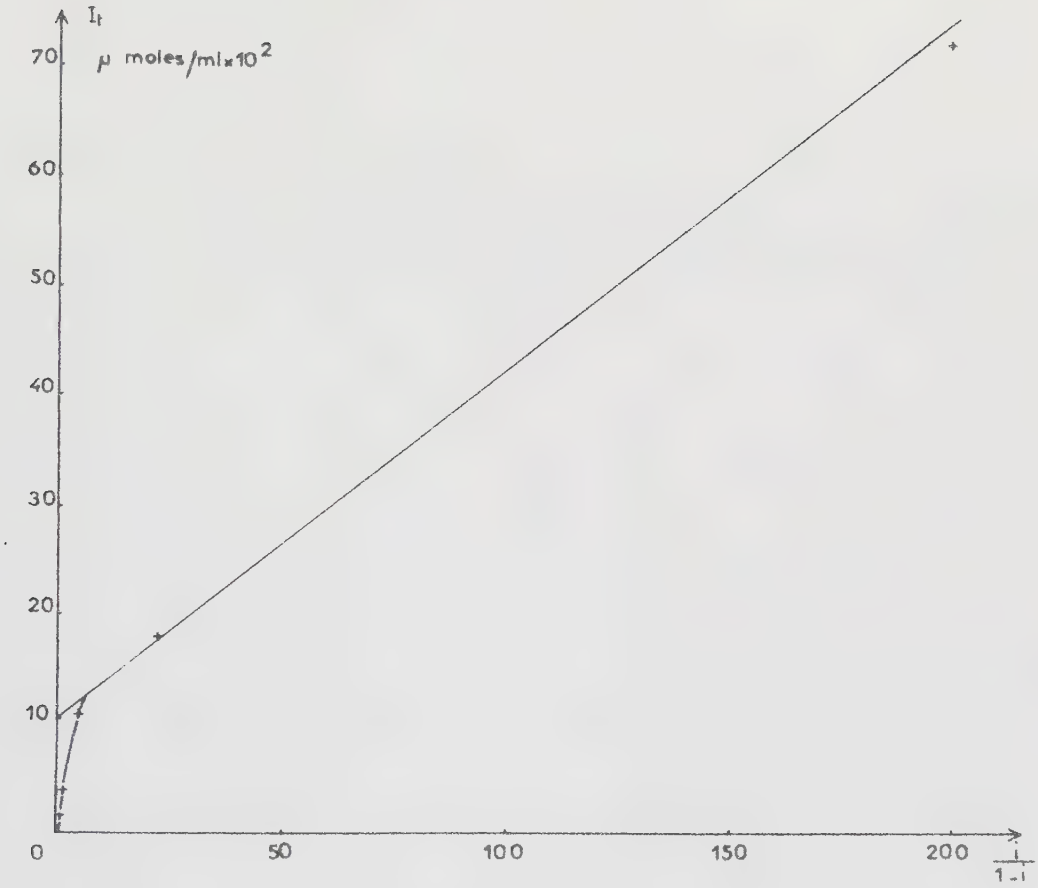



Figure 10 IX

ADN-VERT DE METHYLE (I) : Variations de la fonction $I_t = f\left[i/(I-i)\right]$.

TABLEAU 6 IX

ETUDE DE LA DEGRADATION DU COMPLEXE ADN-VERT DE METHYLE

PAR LA DNase I : COMPOSITION DES SOLUTIONS (2)

| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ADN V 80 2,2 mg/ml | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Tampon tris pH 7,5 0,4M | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| $Mg^{++}$ 0,3M | I | I | I | I | I | I |
| ClNa 0,14 M | 6,5 | 4,5 | 3,5 | 2,5 | 1,5 | 0,5 |
| Vert de méthyle 0,02% | 0 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| DNase I µ g/ml | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |

# T A B L E A U 7 IX

## ETUDE DE LA DEGRADATION DU COMPLEXE ADN-VERT DE METHYLE PAR LA DNASE I : RESULTATS EXPERIMENTAUX (2)

| | Colorant micro-moles/ml x $10^2$ | V | V (corrigé) | η sp° | i | I-i | i/(I-i) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 2,7 | 2,7 | 5,78 | 0 | 1 | 0 |
| 1 | 7,25 | 1,95 | 1,73 | 6,54 | 0,36 | 0,64 | 0,56 |
| 2 | 10,85 | 0,56 | 0,485 | 6,73 | 0,82 | 0,18 | 4,5 |
| 3 | 14,5 | 0,38 | 0,34 | 6,73 | 0,875 | 0,12 | 7,1 |
| 4 | 18,1 | 0,16 | 0,133 | 6,95 | 0,955 | 0,045 | 21 |
| 5 | 21,8 | 0,05 | 0,04 | 7,15 | 0,985 | 0,015 | 58 |

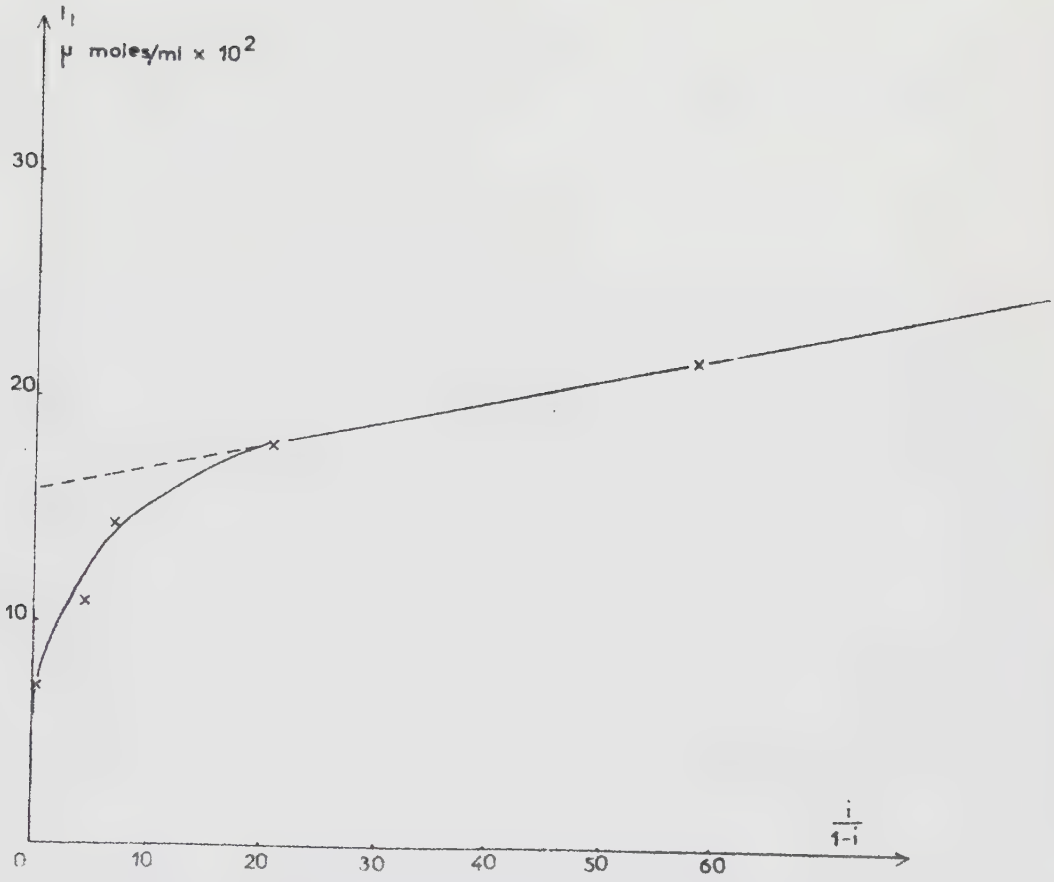



Figure 11 IX

ADN-VERT DE METHYLE (2) ; Variations de la fonction $I_t = f\left[ i/(I - i) \right]$.

De plus, nous les comparerons à ceux que l'on peut éventuellement obtenir par d'autres moyens.

1 - En ce qui concerne la valeur de $K_M$, nous comparerons sa valeur avec celle obtenue au cours de la cinétique de la réaction ADN -DNase.

2 - En ce qui concerne la taille des sites, nous discuterons la valeur obtenue à la lumière des résultats fournis par l'analyse des séquences nucléotidiques dans les ADN.

## 1 - Valeur de $K_M$ -

L'étude de la cinétique de la réaction ADN-DNase, et en particulier l'étude des variations de $I/v$ en fonction de $I/c$ (LE TALAER, 60) montre que $K_M$ correspond à une concentration en ADN de 2 mg/ml dans les mêmes conditions de pH et d'environnement ionique. Si nous rapportons cette valeur aux molécules de sites, nous aurons :

$$K_M = 2 \ 10^{-3} / 2100 = 0,95 \ 10^{-6} \text{ moles/ml.}$$

Cette valeur n'est pas significativement différente de la valeur que nous avons trouvée. Ceci montre bien que les hypothèses avancées lors de l'interprétation des résultats étaient applicables avec une approximation satisfaisante.

## 2 - Taille des molécules de site -

La taille des molécules de site est directement reliée aux nombres de liaisons hydrolysables par la DNase dans la molécule d'ADN. Nous avons vu, que dans le cas de la DNase I pancréatique, ces liaisons étaient toutes les liaisons pPupPy à l'exception des liaisons pGpC. Au chapitre III de ce travail, nous avons montré que le pourcentage de ces liaisons dans la molécule d'ADN de thymus de veau pouvait être calculée

- Par la méthode du voisin le plus proche :

$$\left( (pPupPy) - pGpC \right) = 18,1 \ \%$$

- Par la méthode de CHARGAFF :

$$\left( (pPupPy) - pGpC \right) = 15,6 \ \%$$

Le premier chiffre correspondrait donc à une molécule de site formée en moyenne de 5,5 nucléotides, tandis que le deuxième correspondrait à 6,5 nucléotudes, ce qui est très voisin de la valeur que nous avons trouvée.

La molécule de site considérée ici est identique au résidu de taille R que nous avons utilisé dans l'étude de la cinétique de la DNase au chapitre VIII. Nous avons vu alors, et principalement lors de la discussion des résultats obtenus par THOMAS et APPLEQUIST au chapitre VII, que les résultats expérimentaux attribuaient à R un poids moléculaire correspondant à 5 nucléotides environ.

Les valeurs trouvées par ces deux méthodes sont donc parfaitement cohérentes, ce qui laisse supposer que le modèle que nous avons proposé peut rendre compte des phénomènes observés avec une approximation satisfaisante.

D'autre part, ces deux méthodes pourraient permettre l'étude plus détaillée de la séquence des bases dans l'ADN, si l'on possédait une DNase de spécificité connue et suffisamment étroite. Cette étude pourrait alors être entreprise de deux façons :

- Etude cinétique -

Nous avons démontré au chapitre VIII que la vitesse de dégradation de l'ADN mesurée en viscosimétrie devait varier avec l'inverse de la racine carrée de P.M. du résidu R, autrement dit, comme l'inverse de la racine carrée de la taille de la molécule du site. L'étude précise de la cinétique de la réaction en viscosimétrie permet donc, en principe, de déterminer cette taille, donc de déterminer le nombre de séquences du type hydrolysable. Si la nature de ces séquences est connue, autrement dit, si la spécificité de la DNase est connue, un type de séquence de base donné peut être déterminé, par ce moyen, dans la molécule d'ADN.

- Etude de l'inhibition par complexation du substrat -

Nous avons vu comment cette méthode permettait ici avec plus de précision, mais toutefois avec plus d'incertitude théorique puisqu'un certain nombre d'hypothèses on dû être faites pour conduire le calcul, de déterminer la taille des molécules de site.

D'autre part, ces méthodes permettent de mettre en évidence chez les DNases de spécificités différentes. En effet, si les expériences sont conduites avec un ADN de même origine biologique, la détermination de la taille de R ou de la molécule de site permet la mise en évidence des différences de spécificité pour les DNases d'origines variées, puisque c'est précisément la spécificité de la DNase qui détermine la taille de R.

# CONCLUSION ET RESUME

Ce travail est consacré à l'étude des complexes désoxyribonucléiques dont l'importance est considérable, tant du point de vue biologique (l'ADN existant naturellement complexé à des protéines dans le noyau de la cellule que toxicologique (un certain nombre de toxiques agissant en se complexant à l'ADN) .

L'étude de la complexation de l'ADN et du lysozyme (protéine basique se rapprochant par ses propriétés physico-chimiques des protéines nucléaires) a servi de modèle pour l'étude des complexes nucléoprotéiques naturels.

Les informations recueillies sur les modalités de la fixation du vert de méthyle (colorant histologique du noyau) et de la quinacrine (colorant acridinique doué de propriétés antimalariques et capable de prévenir le phénomène L.E. du lupus érythémateux) permettent d'aider à la compréhension des propriétés pharmacodynamiques et toxiques de ces colorants ou de leurs dérivés en terme de relations moléculaires. Ces dernières recherches peuvent donc s'intégrer dans le cadre de la toxicologie moléculaire dont la définition est esquissée dans l'introduction.

Les moyens d'étude de ces complexes font appel principalement à deux techniques physico-chimiques, la diffusion de la lumière, la viscosimétrie qui assurant la mesure des dimensions et la détermination de la forme des molécules en solution, permettent la mise en évidence et l'étude des complexes désoxyribonucléiques en solution.

Dans le chapitre IV consacré à la diffusion de la lumière, les bases théoriques et les modalités d'utilisation de la méthode sont rappelées. En outre, le problème de son application au cas de l'ADN est discuté. L'attention s'est portée sur les principaux artefacts pouvant fausser les résultats, agrégation des molécules par des traces de protéine. L'effet du traitement par la chymotrypsine des préparations est confirmé, puisque le poids moléculaire de l'ADN de certaines préparations passe d'une valeur infinie à $6\ 10^6$ après ce traitement dont la technique est décrite.

Le modèle dit "pelote vermiforme" permettant de représenter la molécule d'ADN est rappelé. Une méthode graphique pour le calcul rapide des principales caractéristiques de ce modèle est proposée.

Dans le chapitre V consacré à la viscosimétrie, les principales techniques expérimentales ainsi que les bases théoriques permettant l'interprétation des mesures en terme de grandeurs moléculaires sont rappelées. En ce qui concerne l'application de cette méthode au cas de l'ADN, l'attention s'est portée principalement sur deux points. Difficultés de mesurer valablement à l'aide des viscosimètres classiques la viscosité des solutions d'ADN par suite de leur comportement particulièrement non-newtonien ; difficultés d'interpréter les mesures en termes de grandeurs moléculaires.

Les résultats expérimentaux concernant la complexation de l'ADN et du lysozyme obtenus principalement à l'aide de ces deux méthodes sont présentés dans le chapitre VI. A pH constant, il a été mis en évidence trois domaines de force ionique selon que la fixation du lysozyme sur l'ADN est totale, partielle ou nulle. Cette étude permet en outre de montrer que dans des conditions précisées, le lysozyme est capable d'agréger latéralement les molécules d'ADN. Cette dernière constatation est rapprochée des résultats de CAVALIERI qui observe des préparations d'ADN contenant des molécules à 2 n chaînes (avec n = 1, 2, 3...).

L'étude de la complexation des colorants et de l'ADN a été entreprise selon une méthode enzymologique. Cette méthode, telle que nous la proposons, repose sur la théorie de l'inhibition enzymatique par complexation du substrat. Cette théorie comme toutes les théories enzymologiques classiques suppose qu'une molécule d'enzyme ne réagit qu'une seule fois avec une seule molécule de substrat ($S + E \rightleftharpoons (SE)$) et ne peut donc s'appliquer directement au cas de l'ADN. Afin de pouvoir proposer un modèle permettant d'interpréter les résultats expérimentaux, une étude préalable du mode d'action de la DNase est faite. Au cours d'un rapide rappel bibliographique à ce sujet (Chapitre VII) le modèle de THOMAS (ne faisant pas intervenir la spécificité de l'enzyme) est discuté. Il est alors démontré que les résultats expérimentaux obtenus par THOMAS peuvent également être interprétés à l'aide d'un modèle que nous proposons et qui fait intervenir cette spécificité de l'enzyme. Ce dernier modèle, en association avec celui d'APPLEQUIST, permet alors le calcul reliant le nombre de liaisons hydrolysées dans la molécule à la viscosité spécifique des solutions. La vitesse de la réac-

tion enzymatique vraie, ou nombre de liaisons hydrolysées par unité de temps peut alors s'exprimer :

$$v = \frac{K}{2A(\eta)^2 + (\eta)} \quad \frac{I}{\sqrt{M_o}} \quad \frac{N}{\sqrt{R}}$$

L'étude expérimentale démontre la validité de ce calcul et permet de préciser les conditions d'utilisation de la viscosimétrie pour la mesure de la dégradation enzymatique de l'ADN.

Pour permettre l'interprétation des résultats obtenus au cours de l'étude de l'inhibition par complexation du substrat, un modèle est proposé et discuté. Il fait intervenir la notion de "molécule de site", c'est-à-dire qu'à chaque liaison hydrolysable ou site enzymatique du substrat, est associée une molécule dite "molécule de site" équivalente à la molécule de substrat de la théorie. Il est alors montré que dans ces conditions trois grandeurs vont être accessibles :

- la taille moyenne de cette molécule de site, qui permettra le calcul du nombre de séquences en bases d'un certain type dans la molécule d'ADN (séquences définies par la spécificité de l'enzyme) ;

- la constante de dissociation molécule de site-colorant ;

- la constante de MICHAELIS de la DNase.

Les résultats expérimentaux obtenus permettent de montrer la validité du modèle proposé.

La taille de la molécule de site est sensiblement égale à 6 nucléotides, ce qui signifie qu'il existe en moyenne dans la molécule d'ADN extraite du thymus de veau une liaison du type Purine-Pyrimidine (à l'exclusion des liaisons du type G - C) tous les 6 nucléotides. Nous avions montré également que l'étude de la cinétique de la réaction (Chapitre VII) permettait d'attribuer à la molécule de site une taille moyenne de 5 nucléotides. Ces chiffres sont en accord avec ceux que l'on peut calculer grâce aux résultats obtenus par l'analyse des séquences en bases (méthode du plus proche voisin 5,5 nucléotides, méthode de CHARGAFF 6,5 nucléotides).

La constante de MICHAELIS de la DNase est trouvée sensiblement égale à celle mesurée par LE TALAER par une méthode totalement différente. ($0,6\ 10^{-6}$ moles/ml contre $0,95\ 10^{-6}$ moles/ml par la méthode de LE TALAER).

La cohérence des résultats peut donc être considérée comme satisfaisante.

La méthode décrite permettrait, en outre, la mise en évidence de spécificités différentes chez les désoxyribonucléases et l'analyse des séquences en bases d'un type déterminé par la spécificité de l'enzyme utilisé.

Vu :

Le Président
de la thèse,,

M. GUILLOT

Vu :

Le Doyen
de la Faculté de Pharmacie,

G. VALETTE

Vu et Permis d'Imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

J. ROCHE

# B I B L I O G R A P H I E


1 - ALLFREY V.G., MIRSKY A.E., STERN H.
The chemistry of the cell nucleus
Adv.Enzymol. 16/4II/1955

2 - APPLEQUIST J.
A model for random degradation of two stranded polymers and its application to deoxyribonucleic acid.
Arch.Biochem.Biophys. 95/42/1961

3 - ASTBURY W.T., BELL F.O.
X ray study of thymonucleic acid.
Nature 141/747/1938

4 - AUBEL-SADRON G., BECK G., EBEL J.P., SADRON C.
Etude de la précipitabilité des acides nucléiques par les sels d'ammonium quaternaire.
Biochim.Biophys.acta 42/542/1960

5 - AUBIN G., CHENAILLE P., LAMONTHEZIE N., PACLETTI C.
Extraction de l'acide desoxyribonucléique de différents tissus par emploi de la papaïne
Biochim.Biophys.Acta 1963 in press

6 - BANERJEE K.C., PERKINS D.J.
The interactions of some metal ions with deoxyribonucleic and ribonucleic acids in aqueous solution.
Biochim.Biophys.Acta 61/I/1962

7 - BERNARDI G., CHAMPAGNE M., SADRON Ch.
Enzymatic degradation of deoxyribonucleic acid into sub-units
Nature 188/228/1960

8 - BRINKMAN H.C.
Calculation of the viscosity and the sedimentation constant for solutions of large chains molecules taking into account the hampered flow of the solvent through these molecules
Physica 13/447/1947

9 - BRINKMAN H.C.
A calculation of the viscous force exerted by a flowing fluid on a dense swarm of particles
Applied Sci. Research AI/27/1947

10 - BROT C., SZWARC H.
Contribution à l'étude de la détermination de la structure secondaire de l'ADN
J.Chem.Phys. in press

11 - BURTON K.
A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid
Biochem J. 62/3I5/I956

12 - BURTON K.
Frequencies of nucleotide sequence in deoxyribonucleic acids
Biochem J. 77/547/I960

13 - BURTON K., PETERSEN G.B.
The frequencies of certain sequences of nucleotides in deoxyribonucleic acid
Biochem J. 75/I7/I960

14 - BUTLER J.A.V., CONWAY B.E., JAMES D.W.F.
The effect of salts on polyelectrolyte interactions with special reference to deoxyribonucleic acid
Trans.Farad.Soc. 50/612/1954

15 - CAVALIERI L.F., FINSTON R., ROSENBERG B.H.
Multi-stranded deoxyribonucleic acid as determined by X ray irradiation
Nature 189/833/1961

16 - CHARGAFF E.
The problem of nucleotide sequence in deoxyribonucleic acids
in Biological structure and function
Academic Press 1/67/1961

17 - CHARGAFF E.
Isolation and composition of the deoxyribonucleic acids and of the corresponding nucleoproteins
in "The nucleic acids"
Academie Press 1/319/1955

18 - COHEN S.S., LICHTENSTEIN J.
The isolation of deoxyribonucleic acid from bacterial extracts by precipitation with streptomycin
J. Biol. Chem. PC55/1960

19 - CONWAY B.E., BUTLER J.A.V.
Effect of salts on the interaction of nucleic acids particles
J. Polymer.Sc. 12/199/1954

20 - DEBYE P., BUECHE A.M.
Intrinsic viscosity, diffusion and sedimentation rate of polymers in solution
J. Chemical Physics 16/573/1948

21 - DEFRANCE P., DE LESDAIN N.
Dosage colorimetrique des dérivés à base de ribose et des acides ribonucléiques (ARN)
Application à la détection et au dosage de l'ARN et des impuretés à base de ribose dans les acides desoxyribonucléiques (ADN)
Path.Biol. 10/153/1962

22 - DEKKER C.A., SCHACHMAN H.K.
The macromolecular structure of deoxyribonucleic acid;an interrupted two-strand model.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 40/894/1954

23 - DOTY P.,McGILL B.B., RICE S.A.
The properties of sonic fragments of DNA
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 44/432/1958

24 - DRYER R.C., TAMMES A.R., ROUTH J.J.
The determination of phosphorous and phosphatase with Nphenyl-phenylenediamine
J.Biol.Chem. 225/177/1957

25 - DUBOIS E.L.
Effect of quinacrine (atabrine) upon lupus erythematosus phenomenon
Arch.Dermatol. 71/570/1955

26 - EDSALL J.T., WYMAN J.
in "Biophysical chemistry" Academic Press 1958

27 - EINSTEIN A.
Theorie der opaleszenz von homogenen flüssigkeitsgemischen in der nähe des kritischen zustandes
Ann. der Phys. 33/1275/1910

28 - FELSENFELD G., HUANG S.
The interaction of polynucleotides with metal ions, amino acids and polyamines
Biochim.Biophys.Acta 37/425/1960

29 - FRAENKEL-CONRATH H.
The role of nucleic acid in the reconstitution of active tobacco mosaic virus
J.Am.Chem.Soc. 78/882/1956

30 - FRISH H.L., SIMHA R.
The viscosity of colloïdal suspensions and macromolecular solutions
in "Rheology" Academic Press 1/525/1956

31 - GEIDUSCHEK E.P., DOTY P.
Light scattering investigation of the interaction of sodium deoxyribonucleate with bovine serum albumine
Biochim.Biophys.Acta 9/609/1952

32 - HALL C.E., LITT M.
Morphological features of DNA macromolecules as seen with the electron microscope
J.Biophys.Biochem.Cytol. 4/1/1958

33 - HERMANS J.
The effect of chymotrypsin on the molecular weight of deoxyribonucleic acid preparation.
Biochim.Biophys.Acta 32/504/1959

34 - HERMANS J., HERMANS J.J.
Light scattering by random zig-zag and worm like chains
J.Phys.Chem. 62/1543/1958

35 - HERMANS J., HERMANS J.J.
Solution properties of deoxyribonucleic acid (DNA)
I-hydrodynamic behavior
J.Phys.Chem. 63/170/1959

36 - HERMANS J.
Solution properties of deoxyribonucleic acid (DNA)
II-light scattering
J.Phys.Chem. 63/175/1959

37 - HOFSTEE B.H.J.
Soluble complexes of nucleic acids with α chymotrypsin and its derivates
Biochim.Biophys.Acta 55/440/1962

38 - HOFSTEE B.H.J.
Soluble stochiometric complexes of DNA with chymotrypsin and trypsin
Biochim.Biophys.Acta 44/194/1960

39 - JIRGENSONS B.
"Natural organic macromolecules" Pergamon Press 1962

40 - JONES A.J., LETHAM D J.
The nucleotide sequence in deoxyribonucleic acid.Part I The action of mercaptoacetic acid on calf thymus deoxyribonucleic acid
J.Chem.Soc 1956 p. 2573

41 - JONES A.J., LETHAM D.J.
The nucleotide sequence in deoxyribonucleic acid. Part II The alkaline degradation of calf thymus aldehydoapurinic acid di (carboxymethyl) dithioacetal
J.Chem.Soc. 1956 p.2579

42 - JONES A.J., LETHAM D.J., STACEY M.
The nucleotide sequence in deoxyribonucleic acid.Part III The nature of the end groups produced by the alkaline hydrolysis of calf thymus aldehydo-apurinic acid dicarboxymethyldithioacetal
J.Chem.Soc. 1956 p.2854

43 - JONES A.J., STACEY M., WATSON B.E.
The nucleotide sequence in deoxyribonucleic acid.Part IV Deoxyribonucleic acid of mycobacterium phlei.
J.Chem.Soc. 1957 p. 2454

44 - JORDAN D.O.
"The chemistry of nucleic acids" BUTTERWORTH & Co Publ.
London 1960

45 - JORDAN D.O.
The interaction of deoxypentose nucleic acid with metal ions and with organic cations in "the chemistry of nucleic acids".
BUTTERWORTH & Co Publ. London 1960 Page 221

46 - JOSSE J.
Nucleotide sequences in enzymatically sinthesized deoxyribonucleic acid in "The molecular basis of neoplasia"
edited by University of Texas Press 1961

47 - JOSSE J., KAISER A.D., KORNBERG A.
Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid VIII Frequencies of nearest neighbor base sequences in deoxyribonucleic acid
J.Biol.Chem. 236/864/1961

48 - KAWAMATA J., IMANISHI M.
Mechanism of action of actinomycin with special reference to its interaction with deoxyribonucleic acid
Biken's J. 4/13/1961

49 - KAY E.R.M., SIMMONS N.S., DOUNCE A.C.
An improved preparation of sodium deoxyribonucleate
J.Am.Chem.Soc. 74/1724/1952

50 - KHOUVINE Y., GREGOIRE J.
Action de la désoxyribonucléase sur quelques acides desoxyribonucleiques
C.R.Ac.Sciences 231/424/1950

51 - KIRBY K.S.
The preparation of DNA by the p.aminosalicylate phenol method.
Biochim.Biophys.Acta 36/117/1959

52 - KORNBERG A.
Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid
Science 131/1503/1960

53 - KRATKY O., POROD G. .
Rontgenuntersuchung gelöster fadenmoleküle
Rec.Trav.Chim. 68/1106/1949

54 - KUNITZ M.
Cristalline deoxyribonuclease I) Isolation and general properties, spectrophotometric method for the measurement of DNase activity
J.Gen.Physiol. 33/349/1950

55 - KUNITZ M.
Cristalline desoxyribonuclease II) Digestion of thymus nucleic acid (deoxyribonucleic acid) the kinetics of the reaction
J.Gen.Physiol. 33/363/1950

56 - KURNICK N.B.
Lack of inhibition of deoxyribonuclease by heat depolymerized deoxyribonucleic acid
J.Am.Chem.Soc. 76/4040/1954

57 - KURNICK N.B., FOSTER M.
Methyl green III) Reaction with deoxyribonucleic acid, stochiometry and behavior of the reaction product.
J.Gen.Physiol. 34/147/1950

58 - KURNICK N.B., RADCLIFFE I.E.
Relation between DNA and quinacrine and other antimalarials
J.Lab. and Clin.Med. 60/669/1962

59 - LAUNOY L., GUILLOT M., JONCHERE H.
Etude du stockage et de l'élimination de la pentamidine chez la souris et le rat blanc
Ann.Pharm.Franc. 18/273/1960

60 - LE TALAËR J.Y..
Les mecanismes de defense enzymatique contre les acides desoxyribonucleiques considérés comme toxiques moleculaires. Etude physico-chimique.
Thèse doctorat d'état pharmacie PARIS 1963

61 - LIQUORI A.M., DE LERMA B., ASCOLI F., BUTRE C., TRASCIATTI M.
Interaction between DNA and polycyclic aromatic hydrocarbons
J.Mol.Biol. 5/521/1962

62 - LITTLE J.A., BUTLER G.C.
The enzymatic degradation of thymonucleic acid I) The preparation of oligonucleotides
J.Biol.Chem. 188/695/1951

63 - LOISELEUR J.
Mesure de la viscosité in "Techniques de laboratoires"
Masson ed. Paris 1/99/1954

64 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., PARRAND A.L., RANDALL R.J.
Protein measurement with the folin phenol reagent
J.Biol.Chem. 193/263/1951

65 - LUZZATI V., MASSON F., LERMAN L.S.
Interaction of DNA and proflavine; a small-angle X ray scattering study
J.Mol.Biol. 3/634/1961

66 - MANDEL M.
The interaction of spermine and native deoxyribonucleic acid
J.Mol.Biol. 5/435/1962

67 - MIRSKY A.E., RIS H.
The composition and structure of isolated chromosomes
J.Gen.Physiol. 34/475/1951

68 - PAULING L., COREY R.B.
Structure of the nucleic acids
Nature 171/346/1953

69 - PETERLIN A.
Lichtzerstreuung an ziemliclr gestreckten fadenmolekülen
Makromol. Chem. 9/244/1953

70 - PETERLIN A.
Determination of molecular dimensions from light scattering data
Progress in Biophysics 9/175/1959

71 - PILLE
Considérations pharmacologiques sur les diamidines et leur utilisation dans la trypanosomiase.
Médecine Tropicale 13/859/1953

72 - POLSON G.
The isolation and purification of deoxyribonuclease by multimenbrane electrodecantation.
Biochim. Biophys. Acta 22/61/1957

73 - POTTER J.L. RUTTA-LAURILA U. LASKOWSKI M.
Studies of the specificity of DNase I.
I) Hydrolysis of a trinucleotide.
J. Biol. Chem. 233/915/1958

74 - POUYET J. HERMANS J. VENDRELY R.
Physico-chemical characteristics of nucleic acids and nucleoproteins of different preparations.
Trans. Farad. Soc. 53/247/1956

75 - PRIVAT DE GARILHE M. LASKOWSKI M.
Evidence for different specificities of DNase I and DNase II.
Biochim. Biophys. Acta 14/147/1957

76 - PULLMAN B.
Structure électronique, effet mutagène et aptitude à former des complexes "en sandwich" des aminoacridines.
C.R. Ac. Sciences 255/3255/1962

77 - RALPH R.K. SMITH R.A. KHORANA H.G.
Studies on polynucleotides. XV) Enzymic degradation, the mode of action of pancreatic deoxyribonuclease on thymidine, deoxycytidine and deoxyadenosine polynucleotides.
Biochemistry 1/131/1962

78 - REE T. EYRING H.
The relaxation theory of transport phenomena , generalized theory of viscosity.
in "Rheology" Academic Press 2/88/1958

79 - REICH E. FRANKLIN R.M. SHATKIN A.J. TATUM E.L.
Action of actinomycin D on animal cells and viruses.
Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A. 48/1238/1962

80 - REINER J.M.
Inhibition.
in "Behavior of enzyme systems"
BURGESS publ. 1959 chap.8

81 - SADRON Ch.
Deoxyribonucleic acids as macromolecules.
in "The nucleic acids" Academic Press 3/1/1960

82 - SADRON Ch.
L'édifice désoxyribonucléique.
J. Chem. Phys. 58/877/1961

83 - SCHUMAKER V.N.
A physical study of calf thymus deoxyribonucleic acid.
J of Frankl. Institute 266/233/1953

84 - SCHUMAKER V.N. RICHARD E.G. SCHACHMAN H.K.
A study of the kinetics of the enzymatic digestion of deoxyribonucleic acid.
J. Am. Chem. Soc. 78/4230/1956

85 - SCHWANDER H. SIGNER R.
Darstellung von hochmolekularen natrium thymonucleinat aus kabsthymus.
Helv. Chim. Acta 33/1521/1950

86 - SEVAG M.G. LACKMAN D.B. SMOLENS J.
The isolation of the components of streptococcal nucleoproteins in serologically active form.
J. Biol. Chem. 124/425/1938

87 - SHAPIRO H.S. CHARGAFF E.
Studies on the nucleotide arrangement in deoxyribonucleic acid
II) Differential analysis of pyrimidine nucleotide distribution as a method of characterization.
Bioch. Biophys. Acta 26/608/1957

88 - SIGNER R. SCHWANDER H.
Isolierung hoch molekularen nucleisaure aus kabsthymus.
Helv. Chim. Acta 32/853/1949

89 - SINSHEIMER R.L.
The action of pancreatic deoxyribonuclease I. Isolation of mono and dinucleotides.
J. Biol. Chem. 208/445/1954

90 - SINSHEIMER R.L.
The action of pancreatic deoxyribonuclease I. II) Isomeric dinucleotides.
J. Biol. Chem. 215/579/1955

91 - SINSHEIMER R.L.
A single-stranded deoxyribonucleic acid from bacteriophage Ø X174
J.Mol. Biol. 1/43/1959

92 - SMOLUCHOWSKI M.
Molekular kinetische theorie der opaleszenz von gasen in kristischen zustande sowie einiger verwandter erscheinumgen.
Ann. der Phys. 25/205/1908

93 - SOKOL F.
A light scattering study of the interaction of sodium deoxyribonucleate with horse serum albumin.
J. Polym. sc. 30/581/1958

94 - SPENCER J.H. CHARGAFF E.
Pyrimidine nucleotide sequences in deoxyribonucleic acids.
Biochim. Biophys. Acta 51/209/1961

95 - STEINER R.F. BEERS R.F.
The binding of molecules and ions by polynucleotides.
in "Polynucleotides"
ELSEVIER publ. 1961 chap.10

96 - SWARTZ M.N. TRAUTNER T.A. KORNBERG A.
Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. IX) Further studies on nearest neighbor frequencies in deoxyribonucleic acid.
J. Biol. Chem. 237/1961/1962

97 - TABOR H.
The protective effect of spermine and other polyamines against heat denaturation of deoxyribonucleic acid.
Biochemistry 1/496/1962

98 - TAKEMURA S.
Behavior of pancreatic deoxyribonuclease towards deoxyribo-apyrimidic acids.
J. of Biochemistry 46/1285/1959

99 - TAMM C. SHAPIRO H.S. CHARGAFF E.
Correlation between the action of pancreatic deoxyribonuclease and the nature of its substrates.
J. Biol. Chem. 199/313/1952

100 - THOMAS C.A. Jr
The enzymatic degradation of deoxyribonucleic acid.
J. Am. Chem. Soc. 78/1861/1956

101 - THOMPSON R.H.S.
Classification and nomenclature of enzymes. The commission on enzymes of the international union of biochemistry recommands measures of standardization.
Science 137/405/1962

102 - TRUHAUT R.
Leçon inaugurale de la chaire de toxicologie de la Faculté de Pharmacie de Paris.
Ann. Pharm. Franç. 19/283/1961

103 - VALETTE G.
Précis de pharmacodynamie MASSON éd. Paris 1959 page 83.

104 - WATSON J.D. CRICK F.H.C.
A structure for deoxyribose nucleic acid.
Nature 171/737/1953

105 - WATSON J.D. CRICK F.H.C.
The structure of DNA
Cold Spring Harbor Symp. 18/123/1953

106 - WILKINS M.H.F.
Physical studies of the molecular structure of deoxyribose nucleic acid and nucleoprotein.
Cold Spring Herbor Symp. 21/75/1956

107 - WIPPLER C. SCHEIBLING G.
Description d'un appareil pour l'étude de la diffusion de la lumière.
J. Chim. Phys. 51/201/1954

108 - YAMANE T. DAVIDSON N.
On the complexing of deoxyribonucleic acid (DNA) by mercuric ion.
J. Am. Chem. Soc. 83/2599/1961

109 - ZANENHOF S. ALEXANDER H.E. LEIDY G.
Studies on the chemistry of the transforming activity.
J. Exptl. Med. 98/373/1953

110 - ZIMM B.H. CROTHERS D.M.
Simplified rotating cylinder viscosimeter for DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48/905/1962

111 - ZUBAY G. DOTY P.
Nucleic acid interaction with metal ions and amino acids.
Biochim. Biophys. Acta 29/47/1958

TABLE DES MATIERES

-=-=-=-=-=-=-=-=-


Pages

Liste des principaux symboles et abréviations utilisées dans le texte ... 1

INTRODUCTION ..... 2

PREMIERE PARTIE -

Présentation et but du travail

Chapitre I - Les macromolécules et leurs complexes ..... 6

A - Généralités sur les macromolécules et leurs complexes naturels : importance des complexes nucléiques ..... 6

B - Substances susceptibles de se complexer aux acides nucléiques : intérêt pour la biologie, la toxicologie et la pharmacologie de l'étude de cette complexation..... 12

C - Moyens d'étude des complexes nucléiques ..... 13

DEUXIEME PARTIE -

Etude physico-chimique directe des complexes nucléiques.

Chapitre II - Préparation de l'ADN, caractéristiques des produits utilisés ..... 16

Chapitre III - Généralités sur la structure de l'ADN ..... 24

Chapitre IV - La diffusion de la lumière. Application à l'étude des solutions macromoléculaires ..... 49

- Bases théoriques ..... 49

- Appareillage ..... 58

Dépoussiérage des solutions ..... 61

- Pratique des mesures ..... 64

- Application de la diffusion de la lumière au cas de l'ADN ..... 67

- Mesure de dn / dc ..... 78

Chapitre V - La viscosimétrie. Application à l'étude des solutions macromoléculaires ..... 84

- Définition ..... 84

- Théorie de la viscosité ..... 84

- Ecoulement newtonien, écoulement laminaire 87

- Ecoulement dans les tubes capillaires, loi de POISEUILLE ..... 88

- Détermination expérimentale de la viscosité des liquides ..... 89


./.

Pages

- Viscosité intrinsèque des polymères : relation avec leurs grandeurs moléculaires 95

- Application de la viscosimétrie au cas de l'ADN ..... 102

Chapitre VI - Etude de la formation de complexes entre l'ADN et le lysozyme : résultats expérimentaux ..... 105

TROISIEME PARTIE -

Etude enzymologique indirecte des complexes nucléiques ..... 119

Chapitre VII - Généralités sur la dégradation enzymatique de l'ADN .. 120

- Spécificité de la DNase ..... 120

- Mode d'action de la DNase ..... 124

Chapitre VIII - Etude théorique et expérimentale des conditions d'utilisation de la viscosimétrie pour la détermination des activités désoxyribonucléasiques ..... 130

Chapitre IX - Etude de la dégradation enzymatique de l'ADN complexé 152

- Théorie générale de l'inhibition par complexation du substrat ..... 152

- Application de la théorie de l'inhibition par complexation du substrat au cas d'un haut polymère système ADN-DNase. Hypothèses nécessaires, discussion ..... 157

- Nécessité théorique d'une technique très précise de mesure des vitesses de réaction ADN-DNase ..... 161

- Résultats expérimentaux ..... 162

CONCLUSION ET RESUME ..... 185

BIBLIOGRAPHIE

-=-